

DIE RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG
VON INSULIN
UND IHRE ANWENDUNG
ZUR MESSUNG DER SERUMINSULINSPIEGEL
BEIM INSULINBEHANDELTEN DIABETIKER

Richard Gruber

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des Städt.Krankenhauses
München-Schwabing

Direktor: Prof. Dr. O. Wieland

Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin und ihre
Anwendung zur Messung der Seruminsulinspiegel beim
insulinbehandelten Diabetiker

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Richard Gruber
aus München

Jahr
1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz.Dr.L.WEISS
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.H.FRITZ
Dekan:	Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 28.Juni 1977



MEINEN LIEBEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Allgemeines über Antigene und Antikörper	2
II.1. Das Antigen	3
II.2. Die Antikörper	4
II.2.1. Die Antikörperentstehung	4
II.2.2. Die Struktur der Antikörper	5
II.2.3. Funktion und Verteilung der Antikörper im Organismus	6
II.3. Die Antigen-Antikörper-Reaktion	9
III. Die Antigenität der Insuline	12
III.1. Unspezifische Ursachen	12
III.2. Speziesbedingte Unterschiede in der Primärstruktur des Insulinmoleküls	13
III.3. Veränderungen der Sekundär- und Tertiär- struktur als Ursache der Antigenität	16
IV. Die Insulinantikörper	17
V. Die Insulinbestimmung im Blut	20
V.1. Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin	23
VI. Methodischer Teil und Ergebnisse	27
VI.1. Reagentien, Geräte und apparative Ausrüstung	27
VI.1.1. Reagentien	27
VI.1.2. Herstellung der Lösungen	29
VI.2. Durchführung der Insulinbestimmung	32
VI.2.1. Berechnung der Insulinkonzentration in der unbekannten Probe	32
VI.3. Bestimmung des freien- und antikörperge- bundenen Insulins im Serum bei insulin- spritzen Diabetikern	34
VI.3.1. Chromatographische Abtrennung des freien Insulins vom Insulin-Antikörper-Komplex auf Biogel P 60	36

VI.3.2. Abtrennung des Insulin-Antikörper-Komplexes
vom freien Insulin durch Fällung mit
Polyäthylenglykol

40

VII. Zusammenfassung

50

VIII. Literaturverzeichnis

51

Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin und ihre Anwendung zur Messung der Seruminsulinspiegel beim insulinbehandelten Diabetiker.

I. Einleitung

Während die Insulinbestimmung für die Praxis der Diabetesbehandlung eine untergeordnete Rolle spielt, hat sie für wissenschaftliche Zwecke außerordentlich an Bedeutung gewonnen. So hat sie zum Beispiel entscheidend zu unserem Verständnis des menschlichen Intermediärstoffwechsels beigetragen, uns die Einteilung der schon länger bekannten Diabetestypen ermöglicht und detaillierten Einblick gegeben in das Ausmaß der Insulinsekretion durch die Betazelle auf physiologische und pharmakologische Reize.

Die Bestimmung des Insulingehalts im Blut erfolgt entweder indirekt über die Ermittlung seiner biologischen Aktivität (vgl. Tab. 3, 4) oder über die kompetitive Verdrängung radioaktiv markierter Insulinmoleküle im radioimmunologischen Test.

Unter den derzeit verfügbaren Insulinbestimmungsmethoden werden die radioimmunologischen Verfahren (Radioimmuno Assay, RIA) den Forderungen nach Spezifität, Empfindlichkeit, Schnelligkeit, sowie relativ geringen Kosten am ehesten gerecht (PFEIFFER, 1965; SKELLEY et al, 1973; MIDGLEY et al, 1969) und haben sich daher in der klinisch-chemischen Praxis weitgehend durchgesetzt. Das diesen Verfahren zugrundeliegende Prinzip macht es jedoch unmöglich, die Insulinkonzentration in Seren zu bestimmen, die gegen das Hormon gerichtete humorale Antikörper enthalten. Derartige humorale Antikörper lassen sich bei jedem Insulinspritzenden Diabetiker (etwa ein Drittel aller Zuckerkranken) Tage bis Wochen nach Beginn der Behandlung im

Blut nachweisen (KERP et al, 1968; ARQUILLA u. STAVITZKY, 1956; BERSON u. YALOW, 1956; SKOM u. TALMAGE, 1956). Damit sind die bei Stoffwechselgesunden und bei nicht-insulinpflichtigen Diabetikern üblichen Bestimmungsverfahren bei insulinspritzenden Diabetikern nicht durchführbar. Gerade bei dieser Patientengruppe wäre jedoch eine genaue Beantwortung der Frage nach den Beziehungen zwischen therapeutisch zugeführtem, dem im Blut freiverfügbaren, stoffwechselaktiven Insulin und der Güte der Stoffwechseleinstellung wünschenswert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine Methode zu finden, die relativ schnell und routinemäßig durchführbar die spezifische Abtrennung des Insulinantikörperkomplexes im Serum vom freien Insulin ermöglicht, wodurch das freie Insulin der radioimmunologischen Bestimmung zugänglich wird. Ein weiteres Ziel war die Bestimmung des antikörpergebundenen Insulins, zu diesem Zweck sollte der Insulinantikörperkomplex gespalten und der nun unbeladene Antikörper vom freigesetzten Insulin abgetrennt werden.

Vor Erörterung der eigenen Methodik und Ergebnisse soll zunächst ein Überblick über die Gesetzmäßigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion allgemein sowie über den Wissensstand der Antigenität des Insulins speziell gegeben werden.

II. Allgemeines über Antigene und Antikörper

Gerät ein körperfremder Stoff in den Kreislauf eines höheren Wirbeltieres, so werden -vor allem bei wiederholter Zufuhr- die sogenannten immunologisch kompetenten Lymphozyten und Plasmazellen dazu angeregt sich beschleunigt zu teilen und Antikörper zu produzieren. Diese Antikörper haben die Eigenschaft sich mit den eingedrungenen Fremdstoffen zu verbinden und diese so unwirksam zu machen.

Ihre Aufgabe ist es also den Organismus zu schützen und die biologische Einmaligkeit des Individuums zu erhalten. Das Ausmaß dieser "Immunantwort" wird sowohl durch das Antigen selbst, als auch durch eine Reihe weiterer Faktoren bestimmt.

Neben der Tierspezies, man unterscheidet gute und schlechte Antikörperbildner, ist die Art der Zufuhr (intradermal, subcutan, intravenös), die Art der Begleitstoffe (z. B. Freund'sches Adjuvans bei der experimentellen Antikörpererzeugung), sowie die Menge und Kontakthäufigkeit des antigen wirksamen Materials von Bedeutung.

II.1. Das Antigen

Alle Stoffe, die nach parenteraler Aufnahme in den Organismus eine Antikörperbildung in Gang bringen, fallen unter den Begriff der Antigene. Ihrer chemischen Natur nach rekrutieren sie sich aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Nukleinsäuren oder Komplexen dieser Stoffe. Neben einer ausreichenden Molekülgröße mit einem Mindestmolekulargewicht von ca. 1000 muß das Antigen so stabil sein, daß es nicht schon vor Kontakt mit dem Immunsystem durch den Empfängerorganismus zerstört wird. Nicht das ganze Antigen ist wirksam, sondern nur markante Strukturen auf seiner Moleküloberfläche, die man als determinante Gruppen oder Determinanten bezeichnet. Die Antigene sind also weniger durch stoffliche, als durch folgende immunbiologische Eigenschaften charakterisiert:

- 1) Sie rufen die Bildung komplementär strukturierter Antikörper oder entsprechender determinanter Immunzellen hervor (immunogene Fähigkeit).

- 2) Sie gehen mit diesen Antikörpern oder den Immunzellen spezifische Bindungen oder Reaktionen ein, deren Folgen allergische Erscheinungen oder andere Immunphänomene sind.

Nach ihrem immunbiologischen Charakter teilt man die Antigene ein in Heteroantigene, die als körperl- und artfremd zu gelten haben, in Isoantigene, die körperfremd aber arteigen sind und in Autoantigene, die körperl- und arteigen sind.

Diese Regeln gelten für alle Eiweiße und damit die Polypeptidhormone, für die heterologen Hormone mit ihrer unterschiedlichen Primärstruktur und auch für die homologen oder autologen Hormone, wenn ihre Tertiärstruktur auch nur gering geändert ist.

II.2. Die Antikörper

II.2.1. Die Antikörperentstehung

Verschiedene Theorien wurden entwickelt, um die Bildung der Antikörper zu erklären. Die beiden wichtigsten seien hier kurz erwähnt.

Nach der instruktiven oder "Template-Theorie" (F. HAUROWITZ, L. PAULING) prägt sich das aufgenommene Antigen den komplementären Antikörper selbst. Jede immunkompetente Zelle kann also eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern produzieren.

Die selektive Theorie (P. EHRLICH, M. BURNET, 1973) und darauf aufbauend die Theorie der informierten Antikörperbildung (Matritzen oder Clonal Selection Theorie GÜNTHER, 1966) nehmen an, daß für jedes vorhandene Antigen im Organismus bereits spezifische, prädestinierte Zellen vorhanden sind, die durch das Antigen stimuliert werden.

Dieses Signal führt zur wiederholten Teilung der angesprochenen Zelle und zur Antikörperproduktion. Es entsteht eine Zellfamilie (CLON), die einen bestimmten Antikörper produziert.

In den letzten Jahren wurden Techniken entwickelt, die die zelluläre Produktion der Antikörper in vitro sogar an isolierten Lymphozyten oder Plasmazellen zu studieren erlaubten (DUTTON, 1961; BANEY, VASQUEZ u. DIXON, 1962; NOSSAL u. MÄKELÄ, 1962; ATTARDI u. Mit., 1962). Es gelang dabei der Nachweis des "Boostereffektes", der verstärkten Antikörperproduktion beim mehrmaligen Kontakt mit dem Antigen in vitro. Es gilt heute weiter als bewiesen, daß nicht nur verschiedene immunologisch kompetente Zellen verschiedene Antikörpertypen gegen ein und dasselbe Antigen bilden (LAPRESLE, 1955), sondern die einzelne Immunzelle einen Antikörpertyp an das Medium abgeben, einen anderen an seiner Oberfläche gebunden behalten kann (NOSSAL u. MÄKELÄ, 1962). Es ließ sich sogar an der einzelnen Zelle der Übergang der Antikörperproduktion von den großmolekularen 19 S (IgM) zu den niedermolekularen 7 S (IgG) Immunglobulinen verfolgen (NOSSAL u. Mit., 1964). Diese Beobachtungen haben eine große Bedeutung für die als zweite genannte Theorie der sogenannten informierten Antikörperbildung gewonnen.

II.2.2. Die Struktur der Antikörper

Nicht nur die Verschiedenartigkeit der Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen gilt als gesichert, auch der spezifische Antikörper kann in seinem Aufbau und in seiner Affinität zu seinem Antigen verschieden sein. Von den fünf Immunglobulinklassen, die gemäß der jetzt geltenden Nomenklatur als IgG, IgM, IgA, IgE und IgD bezeichnet werden, ist die Struktur der IgG-Klasse heute am besten bekannt. Danach besteht das IgG-Molekül aus 4 Polypeptidketten, von denen zwei mit einem

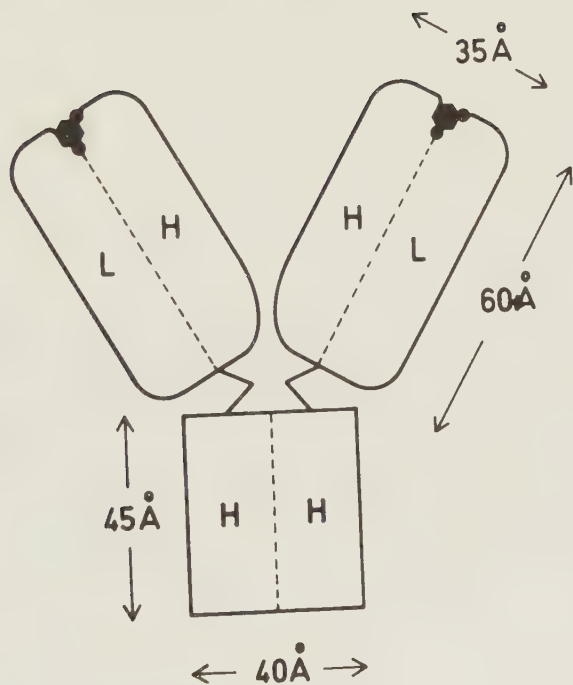
Molekulargewicht von etwa 26.000 als leichte oder L-Ketten, zwei mit einem Molekulargewicht von etwa 54.000 als schwere oder H-Ketten bezeichnet werden. Je eine L- und eine H-Kette falten sich zu einem kompletten Antikörper; er weist eine innere gemeinsame Region auf, in der Disulfidbrücken zur Stabilität des Moleküls beitragen. Für die Bindung an das Antigen besitzt das Molekül auf frei schwenkbaren Schenkeln zwei reaktive Bezirke (Anti-Determinanten) (DREYER u. BENNET, 1965), die in sehr genauer Anpassung komplementär zur auslösenden Antigen-Determinante sind. Die Dimensionen der komplementären Struktur ließen sich experimentell ermitteln, indem man die Bindungsfestigkeit verschiedener Determinanten bekannter Struktur verglich. Eine Determinante mit den Ausmaßen von $54 \times 12 \times 7 \text{ \AA}$ (Abb. 1) besitzt die größte Affinität zu seinem Antikörper.

Die heute übliche Einteilung der Immunglobuline basiert darauf, daß jede dieser Klassen eine für sie typische H-Kette besitzt (α , γ , μ). Da sich diese H-Ketten mit den beiden L-Kettentypen (κ , λ) vereinigen können, sind sechs verschiedene Antikörpertypen zu unterscheiden. Sie sind durch physikalische, chemische und serologische Methoden differenzierbar (HILSCHMANN, 1969).

II.2.3. Funktion und Verteilung der Antikörper im Organismus

Der strukturelle Unterschied der Immunglobulinklassen erklärt auch die unterschiedliche Zahl ihrer antideterminanten Gruppen, wodurch die Wertigkeit der Immunglobuline gegenüber den homologen Antigenen bestimmt wird. So gibt es monovalente oder "inkomplette" Antikörper (z. B. IgE) ebenso wie bi- und multivalente Antikörper (z. B. IgG, IgM). Die Funktion der verschiedenen Immunglobulinklassen sind nur zum Teil bekannt (Tab. 1).

Abb. 1



Modell eines Antikörpers der IgE-Klasse

Tab. 1: Funktionen der Immunglobuline und der Immunlymphozyten (für die Spätreaktion) (nach Günther)

	Zytolyse	Im Kreis- lauf	Im Ge- webe	Sofort- reaktion	Plazenta- passage	Schleimhaut- oberfläche
IgM	+++	+++	+	-	-	+
IgG	+	+++	+++	Arthus- phänomen	+++	++
IgA	-	++	+++	-	-	+++
IgE	-	+	+++	+++	-	?
Lymphozyten	+++	+++	+++	-	-	-

Neben den immunkompetenten Lymphozyten als Träger der Spätreaktion sind die großen Moleküle der IgM-Klasse und in geringerem Maße die IgG-Moleküle zur Zytolyse befähigt. Um unter Komplementbindung Hämolyse an einem Erythrozyten auszulösen, bedarf es eines einzigen an der Oberfläche haftenden IgM-Moleküls, aber mehrerer hundert bis tausend IgG-Moleküle (GÜNTHER, 1969). IgM-Moleküle zeigen gegenüber den IgG-Molekülen eine deutliche Überlegenheit als Opsonine und Agglutinine, nicht dagegen als Präzipitine.

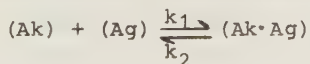
Aus der Verteilung im Organismus ergibt sich auch ein grundlegender funktioneller Unterschied. Während die IgG-Moleküle zwischen Blut und Geweben frei beweglich und somit mengenmäßig im Gleichgewicht sind, sind vom Gesamtbestand an IgM nur etwa 20 % im Gewebe anzutreffen. IgG als neutralisierender und präzipitierender zirkulierender -damit übertragbarer- Antikörper ist beim Arthus-Phänomen anzutreffen und kann bei Übertragung auf das Meerschweinchen die passive kutane Anaphylaxie auslösen. IgG-Moleküle und in erhöhtem Maße auch IgA-Moleküle durchdringen diffus die Schleimhäute und sammeln sich auf der Schleimhautoberfläche gleichsam als Immunbarriere an.

IgA ist auch in Körpersekreten, wie Speichel, Tränenflüssigkeit, Nasensekret, Bronchialsekret, Darmsekreten, Urin und Milch nachweisbar. Die Klasse der IgE ist für die klinische Immunologie deshalb von besonderer Bedeutung, weil sie nachweislich als Reagine für die Entstehung allergischer Krankheiten eine wichtige Rolle spielen.

II.3. Die Antigen-Antikörper-Reaktion

Voraussetzung für die Reaktion von Antigen mit homologen Antikörper oder der sensibilisierten Immunzelle sind komplementäre Oberflächenstrukturen der Reaktionspartner (Determinante und Antideterminante), die so aneinander passen müssen, daß die Van-der-Waal Bindungskräfte nachhaltig wirksam werden; d. h. der Abstand reagierender Atome ist um oder kleiner $= 5 \text{ \AA}$. Je genauer die komplementäre Übereinstimmung der beiden Reaktionspartner ist, umso fester wird die Bindung. Es ließ sich bemerkenswerterweise feststellen, daß beim ersten Kontakt mit dem Antigen die Bindungsenergien zwischen beiden Reaktanten niedriger waren als bei wiederholtem Kontakt, d. h., daß beim zweiten Zusammentreffen bereits "passendere" Antikörper gebildet worden waren. An der Bindung sind zunächst nur die Van-der-Waal-Kräfte beteiligt, die später aber durch das Hinzutreten von Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt werden.

Die oben gezeigte inhomogene Zusammensetzung des IgG-Moleküls und damit seiner Haftstellen erklärt, daß der bivalente Antikörper mit seinem Antigen auf zweierlei Weise reagiert. Für jede Bindungsstelle gelten folgende Gesetzmäßigkeiten:



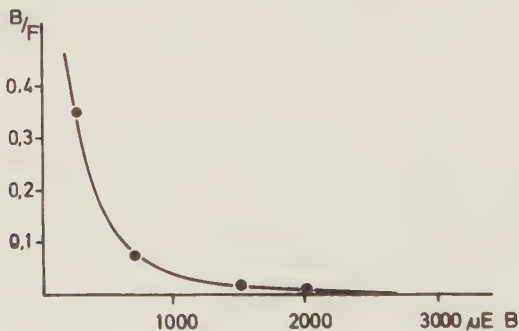
k_1 und k_2 stellen darin die Geschwindigkeitskonstanten für die vorwärts- und rückwärtsgerichtete Reaktion dar.

Weiter ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{(Ak \cdot Ag)}{(Ak \cdot (Ag))} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

Hierin sind Ak = Antikörper, Ag = Antigen, Ak · Ag = Antigen-Antikörperkomplex die Konzentrationen der reagierenden Größen und ihrer Produkte und K die Gleichgewichts- oder Assoziationskonstante. Für jede Antigen-Antikörperreaktion ergeben sich zwei verschieden große Gleichgewichtskonstante K_a und K_b (EISEN u. KARUSH, 1949; CARSTEN u. EISEN, 1955). Lassen sich die Konzentrationen von freiem Antigen, freiem Antikörper und die des Antigen-Antikörper-Komplexes bestimmen, so kann das Verhältnis von gebundenem/freiem Antigen (B/F) in Abhängigkeit vom freien Antigenanteil graphisch dargestellt oder mathematisch beschrieben werden. Die unterschiedliche Reaktionsweise der beiden Bindungsstellen innerhalb eines Antikörpermoleküls drückt sich in der exponentiellen Abhängigkeit des Verhältnisses von B/F zu F aus. Eine Reaktion erster Ordnung müßte dagegen eine lineare Darstellung ergeben. Abbildung 2 zeigt die Heterogenität eines gegen Insulin gerichteten Antikörpers.

Abb. 2



Bindungsverhalten eines Antiinsulinserums gegen Insulin

Die Bindungsenergie zwischen Antigen und Antikörper ist zwischen 7 und 9 Kcal/Mol ähnlich fest und spezifisch wie vergleichsweise die Bindung zwischen Enzym und Substrat. Mit Hilfe von K läßt sich die maximale Bindungskapazität beider Antikörperbindungsstellen für jedes homogene Antigen, ferner, wie oben erwähnt die Variabilität der Antikörperaffinität nach primärer oder sekundärer Stimulierung der Antikörperproduktion (JERNE, 1951), sowie die Geschwindigkeit der Assoziation und Dissoziation beider Reaktionspartner bestimmen.

Die von MARRACK u. HEIDELBERGER getragene Anschauung über die dreidimensionale Gitterstruktur des Immunpräzipitates, in welchem jedes Antikörpermolekül an zwei Antigenmoleküle gebunden ist, konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt und gleichzeitig die Überführung des präzipitierenden in einen löslichen Antigen-Antikörper-Komplex bei Antigen- oder Antikörperüberschuß beobachtet werden (ALMEIDA u. Mit., 1963). Diese experimentellen Ergebnisse decken sich mit theoretischen Überlegungen, die sich leicht aus der oben angeführten Gleichung herleiten lassen. Jede Konzentrationsänderung von Antigen oder Antikörper auf der einen und deren Komplex auf der anderen Seite muß zu einer Störung des Gleichgewichts und damit zur Zerstörung der Antigenbrücken zwischen den Antikörpermolekülen führen. Diese Tatsache erklärt ferner, daß sich Antigen-Antikörper-Reaktionen unter bestimmten Voraussetzungen dem klassischen serologischen Nachweis, wie Hämagglutination, Komplementbindung oder Präzipitationsreaktion entziehen, wohl aber durch verfeinerte Meßtechniken, wie Markierung des Antigens und Berücksichtigung der Reversibilität der Antigen-Antikörperbindung nachgewiesen werden können.

III. Die Antigenität der Insuline

III.1. Unspezifische Ursachen

Die antigenen Qualitäten des Insulins wurden lange Zeit in Frage gestellt. So wird selbst heute noch darüber diskutiert, ob Insulin als schwaches oder starkes Antigen zu gelten hat. Allergische Reaktionen und nachlassende blutzuckersenkende Wirkung bei längerer Anwendung wurden schon bald nach Einführung der Insulintherapie beobachtet (JOSLIN u. Mit., 1922). HANSEN und EYER (1933) vermuteten, daß Verunreinigungen der damaligen Pankreasextrakte eine wesentliche Rolle gespielt hatten, da sich durch Umsetzung auf höher gereinigte Präparate eine Besserung schwerster allergischer Zustände erreichen konnten. SCHIRREN und SAUER (1956) wiesen den allergisierenden Effekt verschiedener stabilisierender oder desinfizierender Zusätze oder Depotkörper nach. Jedoch konnte TUFT als erster 1928 zeigen, daß ein Patient mit allergischer Hautreaktion gegenüber Rohinsulin ebenfalls allergische Hautreaktionen gegenüber mehrfach umkristallisierten Insulin aufwies, aber nicht gegen das Gewebseiweiß des Tieres von dem das Insulin stammte. Während HAUROWITZ (1950) die antigenen Eigenschaften des Insulins für unwahrscheinlich hielt, konnte MORCOS (1965) bereits acht Tage nach Beginn einer intravenösen Insulintherapie bei Geisteskranken das Auftreten insulinbindender und -neutralisierender Antikörper beobachten. Ähnliche Erfahrungen hatten schon 1938 BANTING, FRANKS und GAINNS bei einem Patienten gemacht, der längere Zeit der Insulinschockbehandlung unterzogen wurde. Die insulinneutralisierende Wirkung des Serums des Patienten wiesen sie damals mit Hilfe des Mäusekrampftestes nach.

III.2. Speziesbedingte Unterschiede in der Primärstruktur des Insulinmoleküls

Erst die von SANGER und Mit. (1960) ermittelte Primärstruktur des Insulins und der für die Insuline verschiedener Tierspezies charakteristischen Abweichungen in der Aminosäuresequenz trugen wesentlich zum Verständnis der antigenen Eigenschaften heterologer Insuline bei.

Insulin ist ein Polypeptid, bestehend aus zwei Aminosäureketten, einer A-Kette mit 21 und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren. Beide Ketten sind über zwei Disulfidbrücken zwischen Cysteinmolekülen miteinander verbunden (Abb. 3). Bei den meisten Säugetierinsulinen finden sich die artspezifischen Abweichungen immer in ganz bestimmten Bereichen der Aminosäureketten, nämlich in den Positionen 8 bis 10 der A-Kette (HARRIS, SANGER u. NAUGHTON, 1956) und in der Position 30 der B-Kette (NICOL u. SMITH, 1960). Insuline, die lediglich in einer Position der A-Kette voneinander abweichen, wie z.B. die Insuline von Rind und Schaf, wirken in der komplementären Spezies weniger stark antigen, als bei der Kombination von Tieren mit größeren Unterschieden in der Aminosäuresequenz, wie es z. B. beim Rind und Schwein der Fall ist. Analoges zeigten 1959 BERSON und YALOW beim Menschen. Die für die Diabetestherapie zur Verfügung stehenden Insulinpräparate stammen ausschließlich von Rindern und Schweinen. Das nur in der C-terminalen Aminosäure der B-Kette vom menschlichen abweichende Schweineinsulin wirkt beim Menschen weniger antigen als das zusätzlich in Position 8 bis 10 der A-Kette differente Rinderinsulin. Bei mit Rinder-Schweine-Mischinsulin behandelten Patienten konnte der im Serum vorhandene Antikörper oft, aber keineswegs immer zwischen verschiedenen Insulinen "immunologisch" unterscheiden. So wurde das dem menschlichen Insulin strukturell ferner stehende Rinder- und Schafinsulin stärker gebunden als das weniger differente Schweine- und Pferdeinsulin.

Die geringste Bindung zeigte Humaninsulin selbst. Da das Schweineinsulin trotz seiner nur geringfügigen Abweichung in der endständigen Aminosäure der B-Kette (Alanin statt Threonin) Antikörperbildung beim Menschen hervorrief war die Vermutung widerlegt, daß die antigenen Determinanten der Insuline hauptsächlich im Bereich der A-Kette zu suchen sind. Diese Vorstellungen basieren auf Untersuchungen von WILSON, DIXON und WARDLAW (1962). Sie stellten durch Kettenaustausch sogenannte Hybridinsuline aus isolierten A- und B-Ketten des Rinder- und Kabeljauinsulins her, die wie die beiden nativen Insuline über die gleiche biologische Wirksamkeit verfügten. Insulin aus Kabeljau-A- und Rinder-B-Ketten reagierten wie reines Kabeljauinsulin nur schwach mit Antiseren gegen Rinderinsulin. Insulin aus Rinder-A- und Kabeljau-B-Ketten hingegen wurden fast ebenso stark wie Rinderinsulin an diese Antikörper gebunden. Zur Hemmung ihrer biologischen Aktivität waren also wie aus Tab. 2 ersichtlich wird weniger Antikörper nötig.

Tab. 2: Immunologisches Verhalten von "Hybridinsulinen"
(n. DIXON, 1964)

I n s u l i n		Zur Hemmung der biologischen Aktivität notwendige Anti- körpermengen (Rindervoll- insulin gleich 1 gesetzt)
A-Kette (Rind)-B-Kette (Rind)		1,0
A-Kette (Rind)-B-Kette (Kabeljau)		1,5 - 2,5
A-Kette (Kabeljau)-B-Kette (Kab.)		15 - 21
A-Kette (Kabeljau)-B-Kette (Rind)		14

Erstaunlicherweise ist weder die isolierte A- noch die B-Kette imstande, die Bindung von Insulin an seinen Antikörper zu hemmen (BERSON u. YALOW, 1959). Die gegen die einzelnen Ketten und gegen das komplette Insulinmolekül gebildeten Antikörper zeigten deutliche Unterschiede in ihrem immunologischen Verhalten und müssen sich gegen verschiedene Determinanten richten (YAGI, MAIER u. PRESSMAN, 1962). Darüber hinaus konnten BERSON und YALOW (1961) nachweisen, daß menschliche Antiinsulinseren unterschiedlich stark mit Wal- und Schweineinsulin, bzw. mit Hunde- und Schweineinsulin reagierten, die in ihrer Primärstruktur völlig identisch sind. Um die Versuchsbedingungen spezifischer zu gestalten, entfernten sie die vom menschlichen Insulin abweichende endständige Aminosäure der B-Kette des Schweineinsulins. Das "desalantierte" Schweineinsulin reagierte nach wie vor mit einem gegen Schweineinsulin gerichteten Antikörper (BERSON u. YALOW, 1963).

III.3. Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur als Ursache der Antigenität

Diese Befunde weisen daraufhin, daß die antigenen Eigenschaften der Insuline nicht allein durch ihre unterschiedliche Aminosäuresequenz erklärbar wird. So wiesen zwei menschliche Zuckerkrankte allein nach Behandlung mit kristallisiertem humanem Insulin insulinbindende Antikörper im Serum auf (DECKERT, 1965). Entsprechende Ergebnisse erzielten LOCKWOOD und PROUT (1962) bei Schweinen, RENOLD und Mit. (1964) bei Rindern, KERP (1968) beim Hammel und FENTON (1963) beim Meerschweinchen.

Das Vorkommen insulinbindender neutralisierender Antikörper auch nach Sensibilisierung mit homologen und speziesidentischem Insulin weist darauf hin, daß noch andere Faktoren von Bedeutung sind, die beispielsweise in einer durch

Extraktion und Reinigung veränderten Sekundär- oder Tertiärstruktur des Moleküls liegen können.

Von größerer Bedeutung für die Antigenität "kommerzieller" in der Therapie verwendeter Insulinpräparationen müssen aber auch heute noch Verunreinigungen, wie Monodesamido-Insulin, Dimeres-Insulin oder Proinsulin angesehen werden. Mit der Einführung "reiner" Insuline -Monokomponent Insulin, MC-Insulin- in die Therapie (GALLOWAY u. ROOT, 1972; ROOT u. Mit., 1972; SCHLICHTKRULL u. Mit., 1972) hoffte man dieses Problem gelöst zu haben. Kritische Untersuchungen über die Antigenität von MC-Insulinen (YUE u. TURTLE, 1975) ließen aber erkennen, daß auch diese Präparationen nicht frei waren von den oben genannten Verunreinigungen und daß auch eine langfristige Therapie mit den heute zur Verfügung stehenden MC-Insulinen nicht zu einem Abfall der Antikörpertiter im Patientenserum führte.

IV. Die Insulinantikörper

Der Nachweis von gegen Insulin gerichteten Antikörpern ist auf verschiedene Weise geführt worden:

1. Durch das Auftreten allergischer Reaktionen, wie die direkte anaphylaktische Hautreaktion (TUFT, 1928), die Prausnitz-Küstner-Reaktion, das Schulz-Dale-Phänomen (LEWIS, 1937) und die passive Anaphylaxie (OAKLEY, 1959; PFEIFFER u. DITSCHUNEIT, 1962).

2. Durch klassische serologische Reaktionen, Präzipitation (LOWELL, 1942; LERMAN, 1944; JONES u. CUNLIFFE, 1961), Komplementfixationsreaktion (WASSERMANN, 1940; PAV, 1963), Hämagglutination (ARQUILLA, 1956; STEIGERWALD, 1956; MOINAT, 1958).

3. Durch Neutralisierung der biologischen Insulinwirkung in vivo (BANTING, FRANKS u. GAIRNS, 1938) und in vitro (MARSH u. HAUGAARD, 1952; WRIGHT, 1959).

4. Durch Bindung von ^{131}J -Insulin an Immunglobuline wiesen BERSON und YALOW, 1956 als erste in vivo und in vitro nach, daß praktisch bei allen insulinbehandelten Personen insulinbindende Antikörper auftreten. Gleichartige Beobachtungen machten WELSH u. Mit. (1956), sowie MORSE (1959) und in der Folgezeit viele andere.

Bei der Vielzahl der angewandten Nachweisreaktionen ist es nicht verwunderlich, daß die Frage der Identität dieser auf so verschiedene Weise demonstrierter Antikörper bis heute diskutiert wird. Der für die allergischen Hautreaktionen verantwortliche Antikörper zeigte keinerlei Beziehung zum Insulinbedarf (GOLDNER, 1942; DAVIDSON, 1950). Dies wies bereits darauf hin, daß sowohl für die Insulinresistenz als auch für die Insulinallergie wahrscheinlich verschiedene Antikörper verantwortlich sind. So gehören die insulinbindenden und neutralisierenden Antikörper beim Menschen bevorzugt zu den Immunglobulinen der IgG-Klasse. Dies konnte bei Diabetikern von einer Reihe von Autoren nachgewiesen werden (MORSE u. HEREMANS, 1962; YAGI u. Mit., 1963; CHAO, KARAM u. GRODSKY, 1965; DEVLIN u. O'DONOVAN, 1966). Zu Beginn der Antikörperbildung wurden Antikörper vom IgM-Typ nachgewiesen (SAMOLS u. JONES, 1965; DEVLIN, 1966; KERP, 1968; YAGI, 1963). Ihr Auftreten konnte vom 2. bis 43. Tag nach Beginn einer Insulintherapie (DEVLIN, 1966) verfolgt werden. YAGI (1963) und CERASI (1966) beobachteten Insulinbindung an IgA bei Patienten mit generalisierter Sofortallergie. DOLOVICH u. Mit. (1970) konnten das Auftreten gegen Rinderinsulin gerichteter IgE-Antikörper bei einem Patienten mit generalisierter allergischer Reaktion demonstrieren. Es ist sehr wahrscheinlich, daß Insulinantikörper mit Reagincharakter dieser zuletzt entdeckten Klasse der Immunglobuline angehören, wie es schon für andere Antikörper mit Sofortreaktionen gezeigt wurde.

Schließlich wurden noch Insulinantikörper der IgD-Klasse an drei Diabetikern beobachtet (DEVEY u. Mit., 1970).

Nach heutiger Auffassung führt beim insulinbehandelten Diabetiker das spezieesfremde Hormon in allen Fällen zur Bildung zirkulierender Antikörper der IgG-Klasse. Ihr geht gelegentlich ein meist nur unterschwelliges Stadium verzögerter Allergie voraus, das sich in lokalen Entzündungserscheinungen 12 bis 14 Stunden nach Insulininjektion äußert. Während dieses Stadiums lassen sich zellständige Antikörper gegen Insulin an Leukozyten nachweisen (KERP u. Mit., 1965; FEDERLIN u. Mit., 1966). Es wird abgelöst von einer Periode der Bildung humoraler Antikörper, die sich sowohl auf den neutralisierenden Typ (IgG), als auch auf Reagine (IgA, IgM, IgE) erstreckt.

Während die für die allergischen Hautreaktionen verantwortlichen Antikörper vom Reagintyp keine Beziehung zum Insulinbedarf zeigen (GOLDNER, 1942; DAVIDSON, 1950) führen die insulinbindenden, neutralisierenden Antikörper der IgG-Fraktion zu einem erhöhten Insulinbedarf und zur Insulinresistenz. In allen Fällen jedoch stellen sie -auch bei nur geringer Antikörperkonzentration im Blut- einen Störfaktor der radioimmunologischen Insulinbestimmung dar.

Die klinische Beobachtung, daß bei immunologisch bedingter Insulinresistenz die verminderte Insulinansprechbarkeit plötzlich wiederkommen und eine Hypoglykämie auftreten kann (FANKHAUSER, 1964), spricht dafür, daß die Antigen-Antikörperbindung reversibel und das zugeführte Fremdinsulin nur für die Dauer seiner Antikörperbildung stoffwechselinaktiv ist. Die Frage nach dem Schicksal des antikörpergebundenen Insulins im Organismus läßt sich dahingehend beantworten, daß Beweise für eine bevorzugte Zerstörung des gebundenen Hormons fehlen. Die verlängerte Verweildauer antikörpergebundenen radioaktiven Insulins im Kreislauf (BERSON u. YALOW, 1956) spricht eher für eine Protektion des gebundenen Hormons. Diese Auffassung

wurde durch Versuche von BERSON u. YALOW (1957) und WILLIAMS (1956) untermauert, die eine Inhibierung des enzymatischen Insulinabbaues durch Leberhomogenat in Anwesenheit von Insulinantikörpern beobachteten. Ein erheblicher Anteil des injizierten Hormons mußte andererseits zusammen mit dem Antikörper abgebaut worden sein, ohne jemals an der Zelle aktiv geworden zu sein.

V. Die Insulinbestimmung im Blut

Insulin läßt sich auf Grund seiner Doppelnatur als Polypeptidhormon, das sowohl ein Antigen, als auch eine biologische Substanz darstellt, wie einleitend erwähnt auf biologische und auf immunologische Weise bestimmen.

Die biologischen Verfahren gliedern sich wiederum in in vivo- und in vitro-Techniken. Die in vivo-Techniken am Ganztier bedienen sich der blutzuckersenkenden Wirkung des Insulins als Meßgröße, wobei sich durch Entfernung innersekretorischer Drüsen die Empfindlichkeit der Versuchstiere steigern läßt. Bei den in vitro-Techniken ließen sich die Glukoseaufnahme des isolierten Rattendiaaphragmas und später der Nettogasaustausch, Lipidsynthese und $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus markierter Glukose und die antilipolytische Wirkung einer z.B. durch Katecholamine stimulierten Lipolyse am epididymalen Fettgewebe der Ratte als Meßgröße verwenden.

Diese Methoden besitzen für den Nachweis der biologischen Wirksamkeit von Insulinpräparationen nach wie vor große Bedeutung. Zur routinemäßigen Bestimmung von Insulin im Blut wird jedoch das radioimmunologische Meßverfahren aus den eingangs genannten Gründen bevorzugt. Eine Zusammenstellung der biologischen Verfahren zur in vivo bzw. in vitro Bestimmung zeigen die Tabellen 3 und 4. Auf weitere Einzelheiten der biologischen Teste soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

Tab. 3 Messung der biologischen Aktivität von Insulin in vivo

Präparation	Verab- reichung	Beobachteter Effekt	Empfindlk. (μ E/ml)	Autoren
Intakte Mäuse	s.c.	Krämpfe	2000-4000	Stewart (1960)
Intakte Mäuse	i.v.	Blutzucker- senkung	1000	Beigelman (1958)
Intakte Ratten	i.v.	"	7000	Arquilla (1962)
Intakte Ratten	i.p.	Glycogen- Synth. im Diaphragma	100	Rafaelsen (1961)
Adrenalekto- mierte Mäuse	s.c.	Krämpfe	2000	Hemmingsen u. Nielsen (1938)
Hypophysekt- tomierte Ratten	i.v.	Blutzucker- senkung	1000	Anderson u. Wherry (1962)
Adrenektomierte hypophysektomier- te Ratten	i.v.	"	3000	Gellhorn (1941)
dto	i.v.	"	200	Kosaka (1963)
Alloxandibabetes, hypophysektomierte Ratten	i.v.	"	2000	Randle (1954)
dto	i.v.	"	2500	Beigelman (1956)
Alloxandibabetes hypophysektomier- te Mäuse	i.v.	"	1000-2000	Goetz (1954)
dto	i.v.	"	250	Anderson (1955)
Alloxandibabetes adrenalektomierte Mäuse	i.v.	"	1000	Baird u. Bornstein (1959)
Alloxandibabetes adrenalektomierte hypophysektomier- te Ratten	i.v.	"	125	Anderson (1947)
Alloxandibabetes hypophysekt. adrenalekto- mierte Ratten (A.D.H.A.-Ratten)	i.v.	"	50	Bornstein (1956)

Tab. 4 Messung der biologischen Aktivität von Insulin in vitro

Technik	Empfindlk. (μ E/ml)	Autoren
Glukose-Aufnahme des Ratten-Diaphragmas	5 - 500	Groen u. Mitarb. (1952) Willebrands u. Mit. (1958)
Glukose-Aufnahme des Ratten-Diaphragmas	10 - 100	Vallance-Owen u. Hurlock (1954)
dto	100	Randle (1954/56)
dto	500	Weaver u. Mit. (1958)
Einbau von C^{14} -Glycin in das Eiweiß des Ratten-Diaphragmas	50	Manchester u. Mitarb. (1959)
Netto- CO_2 -Bildung der laktierenden Milchdrüse	2000	Balmain u. Mit. (1954)
Glukose-Aufnahme des epididymalen Fettgewebes der Ratte	10 - 50	Beigelman (1960)
^{14}C CO_2 -Bildung aus 1- ^{14}C -Glukose durch das epididymale Fettgewebe der Ratte	10 - 50	Martin u. Mit. (1958)
dto (modifiziert)	5 - 500	Gliemann (1965)
dto (modifiziert)	10	Ditschuneit u. Mit. (1962)
dto (modifiziert)	5 - 500	Weiss u. Löffler (1975)
Netto- CO_2 -Bildung durch das epididymale Fettgewebe der Ratte	10 - 100	Ball u. Mitarb. (1959)
Antilipolyse, Hemmung der durch ACTH stimulierten Glycerinfreisetzung durch das epididymale Fettgewebe der Ratte	1 - 100	Löffler (1970)

V.1. Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin

Die ersten, die sich eines immunologischen Testes zur Bestimmung kleiner Insulinmengen dienten waren ARQUILLA und STAVITZKY (1956). Sie benutzten eine Hämagglutinationshemmtechnik mit Insulinantikörpern von Kaninchen. Diese Methode war noch nicht empfindlich genug, um Insulin im Serum nachweisen zu können. Sie wurde jedoch in den folgenden Jahren zur Bestimmung von Insulin in Serumextrakten angewandt.

Heute verwendet man für die Insulinbestimmung ein radioimmunologisches Verfahren. Unter dem Begriff Radioimmunoassay (RIA) werden alle Bestimmungsmethoden zusammengefaßt, die auf der Konkurrenz einer nachzuweisenden Substanz mit ihrer radioaktiv markierten Form um die Bindungsstellen an einem spezifischen Antikörper beruhen. Mit Hilfe dieses Meßprinzips können heute neben vielen Hormonen auch eine Reihe anderer Substanzen, die verschiedenen chemischen Klassen angehören, in biologischen Flüssigkeiten quantitativ erfaßt werden.

Die Anwendbarkeit dieses Systems zur Bestimmung von Insulin wurde erstmals von YALOW u. BERSON (1959) demonstriert.

Dabei nutzt man die Bindung von Radiojodinsulin an Insulinantikörper und dessen kompetitive Verdrängung durch das Insulin z. B. einer Serumprobe zur quantitativen Bestimmung des Hormons aus. Der Insulingehalt der Serumprobe wird anhand einer Eichkurve, die aus eingewogenen Mengen kristallinen Insulins angesetzt wurde, ermittelt. Die Konzentration des Radioinsulins wird im unteren physiologischen Meßbereich gewählt und der Titer des antikörperhaltigen Serums derart eingestellt, daß sich das radioaktiv markierte Insulin in leichtem Überschuß befindet. Durch Zusatz von Serum mit einem gewissen Gehalt an endogenem Insulin oder von kristallinem Insulin zu diesem konstant eingestellten System von Radioinsulin und Insulinantikörper nimmt der Anteil des gebundenen Radioinsulins

in Abhängigkeit von der zugesetzten Insulinmenge exponentiell ab. Zum Nachweis der Menge an antikörpergebundenem, markierten Hormon ist die Trennung von freiem und gebundenem Hormon notwendig. Die möglichst saubere Auftrennung der beiden Anteile des nur in geringsten Mengen (Picogramm bis Nanogramm) vorliegenden Hormons in vergleichsweise proteinreichem Medium stellt einen der kritischen Punkte dieses Meßverfahrens dar. Nach Abtrennung des freien vom gebundenem Hormon wird die Radioaktivität entweder des freien oder des antikörpergebundenen Insulins in einem Gamma-Zähler gemessen.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die gebräuchlichsten Trennverfahren. Es handelt sich um die Chromatoelektrophorese, die Salzfällung, die Immunpräzipitation und die Adsorption der freien Insulinanteile an verschiedene Feststoffe. Die von YALOW u. BERSON (1959) ursprünglich beschriebene Methode benutzt zur Trennung die unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der beiden Insulinanteile. Während das freie Insulin bei der Elektrophorese auf der Auftragsstelle liegen bleibt wandert das antikörpergebundene Insulin mit den Immunglobulinen. Die Radioaktivität wird mit Hilfe eines Scanners gemessen. Diese Technik ist relativ aufwendig, eignet sich daher nicht zur Messung größerer Serien und verlangt verhältnismäßig hohe spezifische Aktivitäten des radioaktiven Hormons. Sie wird daher heute nur noch bei speziellen Fragestellungen angewandt.

Die Salzfällung des Insulin-Antikörper-Komplexes (GRODSKY u. FORSHAM, 1960) wird wegen der Kopräzipitation anderer Serumproteine, wobei es zu einem einschlußlöslichen Insulin kommen kann, ebenfalls nur mehr selten benutzt. HEDING (1969) beschrieb die Präzipitation mit Alkohol, die ähnliche Fehlerquellen birgt. Eine Präzipitation des Insulin-Antikörper-Komplexes mit Hilfe der sogenannten Doppelantikörpermethode wurde von MORGAN u. LAZAROW (1963) sowie von HALES u. RANDLE (1963) beschrieben. Der hierbei verwendete zweite Antikörper ist gegen das Insulin-Antiserum gerichtet und wird in einer

Tab. 5 Verfahren zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Insulin
(LÖFFLER u. WEISS, 1975)

Verfahren	Messung von
Chromatoelektrophorese	B + F
Gelfiltration	B + F
Salzfällung mit Natriumsulfat	F
Alkoholfällung	F
Fällung mit Anti- γ -Globulinserum	F
Adsorption an Anionenaustauscher Amberlite C G 400 I	F
Adsorption an Cellulose	F
Adsorption von Antikörper an Gefäßwand	F (Festphase)
Adsorption von Antikörper an Sephadex	F (Festphase)
B = Antikörpergebundenes Radioinsulin F = Freies Radioinsulin	

zweiten Tierspezies durch Injektion der Gammaglobulinfraktion des Tieres erzeugt, welches gegen Insulin immunisiert werden soll. Bei Bindung des zweiten Antikörpers an das Insulin-antiserum kommt es zur Präzipitation. Die Trennung des antikörpergebundenen Insulins läßt sich also problemlos durch Zentrifugation oder durch Filtration gestalten. Der Vorteil der Doppelantikörpermethode liegt darin, daß nur verhältnismäßig geringe spezifische Aktivitäten des Radioinsulins notwendig sind.

Eine weite Verbreitung haben die Methoden zur Insulinbestimmung gefunden, bei denen die Trennung durch verschiedene Adsorbentien erfolgt. MEADE u. KLITGAARD (1962) benutzten als Bindemittel für das freie Insulin den Anionenaustauscher Amberlite CG-400 I. Daneben wurde die Adsorption des freien Hormons an Zellulose (ZAHARKO, 1968), Talkum oder Siliciumoxyd (ROSSELIN u. Mit., 1966) sowie an Dextran beschichtete Aktivkohle (HERBERT u. Mit., 1965; KEANE u. Mit., 1968; TRAUTSCHOLD u. Mit., 1969; POZNANSKI, 1969; LÖFFLER u. WEISS, 1975) beschrieben. Die Adsorptionsverfahren haben gegenüber der Doppelantikörpermethode den Vorteil, daß die Trennung von gebundenem und freiem Hormon sehr schnell erfolgt und ein zweiter Inkubationsschritt nicht notwendig wird. Nachteilig ist, daß die Adsorption durch Serumproteine beeinflusst wird. Deshalb ist es notwendig in der Eichkurve entweder von Anfang an die Bedingungen der Probe nachzuahmen, d.h. die Standardwerte in insulinfreiem Serum zu lösen oder ein normales Serum kurz vor dem Trennschritt zuzusetzen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Systeme einer sogenannten Solid-Phase-Methode beschrieben. Hierbei nützt man die Möglichkeit das Hormon oder seinen Antikörper physikalisch oder chemisch an hochmolekulare unlösliche Polysaccharide oder Polymere zu koppeln aus. Das gebundene Hormon läßt sich am Ende der Inkubation dann durch einfaches Zentrifugieren vom freien Hormon abtrennen (WIDE u. PORATH, 1966). Eine Modifikation stellt das von CESKA u. Mit. (1970) be-

schriebene Verfahren dar, bei dem die Innenwand des für die Inkubation verwendeten Gefäßes mit dem Antikörper beschichtet ist. Nach der Inkubation haftet das gebundene Insulin über den Antikörper fixiert an der Gefäßwand; das freie, lösliche Hormon wird durch Absaugen oder Dekantieren entfernt.

Wie in Ringversuchen zur Insulinbestimmung in den letzten Jahren offensichtlich wurde, weisen die oben geschilderten Trennverfahren im Bezug auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit keine wesentlichen Unterschiede auf. Sie unterscheiden sich jedoch erheblich hinsichtlich des Zeitaufwandes für die Einzelbestimmung und in ihrer Störanfälligkeit.

Im Folgenden soll die von uns angewandte Methode zur radioimmunologischen Bestimmung von Insulin im Serum beschrieben werden, bei der die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin nach HERBERT (1965) durch Adsorption des freien Insulins an dextranbeschichtete Aktivkohle durchgeführt wird.

VI. Methodischer Teil und Ergebnisse

VI.1. Reagentien, Geräte und apparative Ausrüstung

VI.1.1. Reagentien

Jodmarkiertes Insulin vom Schwein für radioimmunologische Insulinbestimmungen (NOVO-Industrie, Kopenhagen; Hoechst, Frankfurt/Main-Hoechst). Von den zur Verfügung stehenden ^{131}Jod - und ^{125}Jod -Isotopen hat sich die Verwendung des zwar energieärmeren, jedoch langlebigeren ^{125}Jod (Halbwertszeit = 60 Tage) durchgesetzt. Im allgemeinen wird Insulin nach dem bereits oben erwähnten Verfahren nach GREENWOOD u. HUNTER (1962) markiert.

Daneben stellt die Markierung mit Jod-Monochlorid eine sehr schonende Technik dar, die jedoch nur zu geringeren spezifischen Aktivitäten führt. Bei der höheren Zählausbeute der heute verwendeten Meßgeräte genügt eine Markierung von 100 bis 200 μCi pro μg Insulin, um eine ausreichende Empfindlichkeit im Test zu erreichen.

Anti-Insulinserum

Für die radioimmunologische Insulinbestimmung werden im allgemeinen Insulinantikörper vom Meerschweinchen verwendet. Als käufliches Präparat ist Anti-Insulinserum von folgenden Firmen erhältlich: Arnel Products Company, New York, U.S.A.; Behring-Werke, Marburg a.d. Lahn; Burroughs Wellcome, Beckenham/England; Eli Lilly, Indianapolis/U.S.A.; Novo Pharmazeutika, Mainz. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit Insulinantikörper selbst zu gewinnen. Für die Erzeugung von Insulinantikörpern bei Meerschweinchen sei auf die Arbeiten von (MELANI u. Mit., 1965; SOELDNER, 1965; SAMOLS u. Mit., 1964; ROBINSON u. Mit., 1961; CESKA u. Mit., 1970; SKOM u. TALMAGE, 1958; GREENWOOD u. HUNTER, 1962) verwiesen.

Barbitalnatrium-Puffersubstanz (Merck, Darmstadt)

Natriumacetat, wasserfrei, p.a. (Merck, Darmstadt)

Serumalbumin vom Rind (Behring-Werke, Marburg/Lahn;

SERVA, Heidelberg)

Dextran, Molekulargewicht 80 000 (Fluka, Schweiz)

Aktivkohle: Norit A, Pat. Gr. 4-5 μ (SERVA, Heidelberg)

Natriumazid, p.a. (Merck, Darmstadt)

Humaninsulin oder Insulin vom Schwein,

kristallisiert, frei von Proinsulin, C-Peptid und Insulin-spaltprodukten. (Hoechst, Frankfurt/Main; Novo Pharmazeutika, Mainz)

VI.1.2. Herstellung der Lösungen:

Pufferlösungen

Stammlösung

7,35 g Barbitalnatrium, 4,85 g Natriumacetat und 5 g Natriumazid werden mit Wasser auf 250 ml gelöst.

Arbeitspuffer

50 ml der Stammlösung werden zu 900 ml 0,85 % Natriumchloridlösung gegeben. Mit ca. 5 ml 0,1 NHCL wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Volumen der Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Albuminpuffer

2,5 g Serumalbumin werden in 500 ml Arbeitspuffer gelöst.

Kohle-Dextran-Gemisch

12,5 g Aktivkohle werden in 250 ml Arbeitspuffer in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben suspendiert. 1,25 g Dextran werden in 250 ml Arbeitspuffer vollständig gelöst, zur Kohlesuspension zugegeben und die Mischung kräftig gerührt. Einige Chargen von Aktivkohle enthalten alkalische Verunreinigungen und zeigen in Suspension pH-Werte um 9. Sie sind für die Insulinbestimmung nicht geeignet. In jedem Fall wird der pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt. Während der Zugabe des Kohle-Dextran-Gemisches bei der Bestimmung ist darauf zu achten, daß die Kohle-Dextran-Partikel durch Rühren in Suspension gehalten werden.

Radio-Jod-Insulin

^{125}J -Insulin wird in Albuminpuffer je nach spezifischer Aktivität bis zu einer Konzentration von 20 bis 50 μE pro ml verdünnt. Bei älteren Chargen von markiertem Insulin empfiehlt es sich, die durch Radiolyse entstandenen Zerfallprodukte durch Säulenchromatographie an Sephadex G-75 oder Biogel P 60 abzutrennen (MEADE u. KLITGAARDE, 1962).

Insulin-Standard-Lösungen

50 E (1,8 bis 2 mg) Human- oder Schweineinsulin werden in 1 ml 0,03 N Salzsäure gelöst. Diese Stammlösung ist tiefgefroren über Monate haltbar. Durch Verdünnung mit Albuminpuffer wird eine Insulinstandardlösung mit einer Konzentration von 400 $\mu\text{E}/\text{ml}$ hergestellt. Diese Lösung ist für jede Eichkurve neu anzufertigen.

Antikörperverdünnung

Die für Vorversuch und Bestimmung notwendigen Verdünnungen des meist lyophilisierten oder tiefgefrorenen Antikörpers werden ebenfalls mit Albuminpuffer durchgeführt.

Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Antikörperverdünnung

Damit die Antigen-Antikörper-Reaktion unter optimalen Bedingungen ablaufen und eine größtmögliche Empfindlichkeit im Test erreicht werden kann, ist es wie in jeder chemischen Reaktion notwendig, daß die Reaktionspartner in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis vorliegen. Dieses Verhältnis hängt sowohl von der Höhe des Antikörpertiters, als auch von der Konzentration und spezifischen Aktivität des Radioinsulins ab, und muß daher in einem Vorversuch für jede Antikörper- oder Radioinsulincharge neu ermittelt werden. Zu diesem Zweck bedient man sich des in Tabelle 6 angegebenen Testansatzes.

Tabelle 6 Ermittlung der optimalen Antikörperverdünnung:

	K (ml)	AK (ml)	AK + Insulin (ml)
Insulin (200 μ E/ml)	-	-	0,05
Albuminpuffer	0,40	0,30	0,25
Radioinsulin	0,10	0,10	0,10
Antikörper- verdünnung	-	0,10	0,10

1 Minute mischen, 120 Minuten bei 37°C inkubieren

Kohle-Dextran- Gemisch	0,50	0,50	0,50
---------------------------	------	------	------

1 Minute mischen, 4 Minuten mit 12 000 x g zentrifugieren,
zur Bestimmung der Radioaktivität jeweils 0,5 ml des Über-
standes einsetzen.

K = Bestimmung der unspezifischen Aktivität

AK = Bestimmung der für ca. 50 % Bindung notwendigen
Antikörperverdünnung

AK + Insulin = Bestimmung der Antikörperverdünnung, bei der
der steilste Abfall der gebundenen Radio-
aktivität durch 10 μ E Insulin erfolgt.

Die Antikörperkonzentration für die Insulinbestimmung soll
so gewählt werden, daß zwischen 40 und 60 Prozent des zu-
gesetzten Radioinsulins gebunden und durch 10 μ E Standard-
insulin eine größtmögliche Abnahme von Radioinsulin aus
der Antikörperbindung erreicht wird.

VI.2. Durchführung der Insulinbestimmung

Zur Aufstellung der Standard Eichkurve werden die in Tab. 7 angegebenen Ansätze jeweils dreifach pipettiert. Der Antikörper wird in einer optimalen Verdünnung (ca. 50 %ige Bindung des Radioinsulins bei 0 exogenem Insulin entsprechend dem Vorversuch) eingesetzt. Es werden Standardinsulinkonzentrationen zwischen 5 und 200 μ E/ml verwendet. Beim vorliegenden Test wird vor allem der Trennschritt des freien, vom antikörpergebundenen Insulin durch noch unbekannte Bestandteile der Serumprobe beeinflusst. Um diese Bedingungen in der Standardkurve zu imitieren werden den Standards jeweils 0,1 ml insulinfreies Serum (Serum, das nach 48-stündigem Hungern gewonnen und bei Bedarf noch einige Stunden bei 50°C gehalten wurde) zugesetzt. In weiteren Versuchen zeigte es sich, daß dieser Serumzusatz auch unmittelbar vor Zugabe des Kohle-Dextran-Gemisches erfolgen konnte, ohne daß die Gestalt der Eichkurve verändert wurde (siehe Abb. 6). Bei diesem Vorgehen können auch Seren (z.B. Kontrollseren, wie Labtrol), die nicht völlig insulinfrei sind, verwendet werden. Auch die Meßproben werden nach Möglichkeit in Dreifachansätzen pipettiert.

VI.2.1. Berechnung der Insulinkonzentration in der unbekannten Probe

Zur Berechnung der Insulinkonzentration in den unbekannten Proben werden diese anhand der mit den Standardwerten ermittelten Eichkurve abgelesen. Beim vorliegenden Verfahren wird die Radioaktivität des Tracer-Insulins, die an den Antikörper gebunden bleibt, gemessen. Trägt man die Impulse pro Minute des Meßwertes, von denen die Impulse der unspezifischen Bindung (ermittelt über die Messung der verbleibenden Radioaktivität im Überstand bei Inkubation ohne exogenes Insulin und ohne Antikörper) abgezogen werden in Prozenten der jeweiligen Impulse bei 0 exogenem Insulin auf ($B \times 100 / B_0$) gegen die im Ansatz enthaltene Insulinkonzentration (linear) auf, so erhält man die in Abb. 6 dargestellte Abhängigkeit.

Tab. 7 Pipettierungen zur Insulinbestimmung

	K	AK	Standard	Probe
Albuminpuffer	0,3	0,2	0,1	0,2
Stand.-Insulin (variabel)	-	-	0,1	-
Ak-Verdünnung	-	0,1	0,1	0,1
Probe	-	-	-	0,1
Insulinfr. Serum	0,1	0,1	0,1	
1'schütteln, 60' im Eisbad inkubieren				
Radioinsulin	0,1	0,1	0,1	0,1
1'schütteln, 180' im Eisbad inkubieren				
Kohle-Dextran-Gemisch	0,5	0,5	0,5	0,5

1' schütteln, 4' zentrifugieren mit 12 000 xg;
zur Messung der Radioaktivität je 0,5 ml des
Überstandes einsetzen.

Wird bei Beibehalten der Ordinate die Insulinkonzentration auf der Abszisse logarithmisch aufgetragen, so erhält man über einen bestimmten Bereich der Eichkurve eine weitgehende Linearisierung. Ein Verfahren, das sich heute bei vielen Radioimmunoassays bewährt hat ist die Logit-Umformung von B/B_0 aufgetragen gegen den Logarithmus der Insulinkonzentration in der Eichkurve (Logit-Log-Verfahren). Mit dieser Methode läßt sich eine weitgehende Linearisierung der Eichkurve erreichen und so die Insulinkonzentration der auf dieser Kurve abgelesenen unbekannten Probe berechnen. Da aber in den oberen und unteren zehn Prozent der Eichkurve doch beträchtliche Abweichungen von der Linearität gefunden werden, setzt sich ein weiteres Verfahren, die Umformung der Impulsraten nach Spline-Algorithmus (MARSCHNER u. Mit., 1974) mehr und mehr durch. Dieses Verfahren beruht darauf, daß die Insulineichkurve (prozentuale Bindung linear gegen Insulinkonzentration logarithmisch) in eine Folge von Einzelabschnitten zerlegt wird, die jeweils nach einer Funktion dritten Grades aufgelöst werden. Dabei wird durch raffinierte Rechentricks der Kurvenverlauf geglättet, so, daß die einzelnen Kurvenabschnitte stetig ineinander übergehen. Die Verwendung des Spline-Algorithmus setzt allerdings das Vorhandensein einer leistungsfähigen Rechenanlage voraus.

Die in dieser Arbeit berichteten Insulinbestimmungen wurden über **das** Logit-Log-Verfahren berechnet.

VI.3. Bestimmung des freien- und antikörpergebundenen Insulins im Serum bei insulinspritzenden Diabetikern

Sehr bald stellte sich heraus, daß die üblichen radioimmunologischen Insulinbestimmungsverfahren (wie sie oben beschrieben wurden) bei insulinspritzenden Diabetikern zu falschen Meßergebnissen führten, da sich beim insulinspritzenden Diabetiker in jedem Fall, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, Antikörper gegen das zugeführte Fremdinsulin

(Rinder- bzw. Schweineinsulin) bilden. Mit der Serumprobe werden daher unbekannte Mengen insulinbindender Globuline in das Testsystem, das definierte, konstante Mengen von Radioinsulin und Insulinantikörper enthält, eingebracht. Je nach angewandter Verfahrenstechnik für die Trennung von antikörpergebundenem von freiem Insulin und der Art der Messung (freier bzw. antikörpergebundener Tracer) resultieren entweder zu hohe oder zu niedrige Werte für den Insulingehalt der Probe.

Andererseits bestünde aber gerade bei insulinspritzenden Diabetikern besonderes Interesse Informationen über den wahrscheinlich einzig stoffwechselwirksamen (freien) Insulinspiegel unter der Therapie zu erhalten. Daher wurden eine Reihe von Verfahren zur Messung des freien Insulinspiegels versucht. Voraussetzung für die Insulinbestimmung ist in jedem Fall eine zuverlässige und vollständige Trennung des freien Insulins vom antikörpergebundenen Insulin. Mehrere Autoren benützen Säureäthanol zur Abtrennung des Insulin-Antikörper-Komplexes und Extraktion des Insulins aus dem Serum. GRODZKY, (1965) fand in Anwendung dieses Verfahrens in den Seren zweier insulinresistenter Patienten hohe Gesamtinsulinspiegel von 12.000 $\mu\text{E/ml}$. HEDING und VOLUND (1960) und HEDING (1969) beschrieben eine Routinemethode der Insulinextraktion mit Säureäthanol.

Bei einer Reihe insulinbehandelter Diabetiker mit 10 - 120 Einheiten Insulin-Tagesbedarf ermittelten sie Insulinkonzentrationen von 0 - 3000 $\mu\text{E/ml}$ Serum. Eine ähnliche Nachweismethode für Insulin im Plasma lieferten OHNEDA u. Mit. (1970) wobei gleichzeitig ein unspezifischer Hemmstoff beseitigt wurde, der die anschließende immunologische Insulinbestimmung mit präzipitierenden Antikörper empfindlich störte. Die Bestimmung des immunologischen meßbaren Insulins durchgeführt in 8 Seren, ergab Werte von 10 - 390 $\mu\text{E/ml}$. In eigenen Untersuchungen zu diesem Problem bedienten wir uns zuerst einer

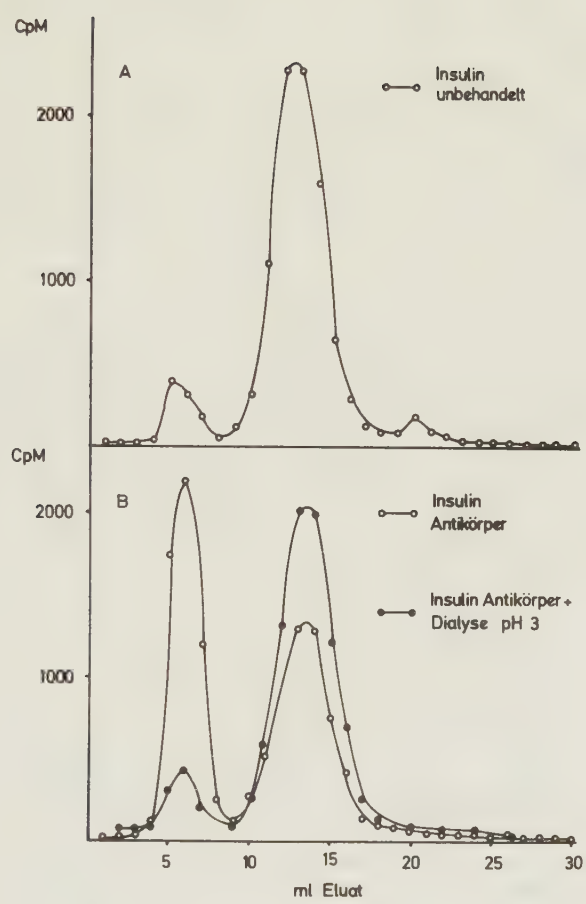
Modifikation eines von C. HEDING (1969) beschriebenen Verfahrens. Das Prinzip des Verfahrens besteht in der Extraktion des freien Insulins durch Äthanol aus dem Serum, während das gebundene Insulin nach vorausgehender Spaltung des Antigen-Antikörper-Komplexes durch Inkubation bei pH 3 extrahiert wird. Die Menge des gebundenen Insulins ergibt sich aus der Differenz von Gesamtinsulin und freiem Insulin. Leider mußte dabei festgestellt werden, daß zwar innerhalb einer Serie die Wiederfinderate mit dieser Methode brauchbar war, daß aber stark streuende Ergebnisse von Versuch zu Versuch erzielt wurden.

Um diesen Schwierigkeiten aus dem Weg zu gehen wurde ein neues Verfahren ausgearbeitet, dessen Grundlage die gel-chromatographische Trennung des freien Insulins (Molekulargewicht 6.000) vom Insulin-Antikörper-Komplex (Molekulargewicht größer als 100.000) war.

VI.3.1. Chromatographische Abtrennung des freien Insulins vom Insulin-Antikörper-Komplex auf Biogel P 60

Wie dem in Abb. 4 dargestellten Elutionsdiagramm zu entnehmen ist, gelingt infolge des großen Unterschiedes im Molekulargewicht die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin ohne Schwierigkeiten. Das Diagramm A zeigt die Elution von Insulin im Serum eines Patienten ohne nachweisbaren Insulinantikörper. Zur besseren Kennzeichnung wurde der untersuchten Probe ¹²⁵Jod-Insulin zugesetzt. Das Insulin erscheint als einheitlicher Gipfel an der einem Molekulargewicht von 6.000 entsprechenden Stelle. In einer antikörperhaltigen Serumprobe (Diagramm B) erscheint der am antikörpergebundene Teil des Insulins in den einem hohen Molekulargewicht entsprechenden Fraktionen, während nur eine geringe Menge an freiem Insulin nachweisbar ist. Wird die Serumprobe einer 24-stündigen Dialyse gegen einen Citratpuffer bei pH 3 unterzogen löst sich die Antigen-Antikörperbildung.

Abb. 4



Chromatographische Abtrennung des freien Insulins vom Insulin-Antikörper-Komplex auf Biogel P 60 (Einzelheiten siehe Text)

Bei anschließender Chromatographie bei pH 3 findet sich trotz Anwesenheit von Antikörpern die gesamte Insulinaktivität in der dem freien Insulin entsprechenden Zone.

Zur Standardbestimmung des freien Insulins in der antikörperhaltigen Serumprobe wurden 0,5 ml Serum in der Säulenchromatographie auf Biogel P 60 (1,2 cm x 25 cm) unterzogen. Elutionsmittel war 25 mMol Phosphatpuffer, pH 7,5, dem 0,5 %iges Serumalbumin vom Rind zugesetzt wurde. Zur Bestimmung des Gesamtinsulins wurden 0,5 ml Serum durch 24-stündige Dialyse gegen 25 ml Citratpuffer, pH 3 angesäuert. Die anschließende Gelfiltration erfolgte ebenfalls auf Biogel P 60, das Elutionsmittel war in diesem Fall 25 mMol Citratpuffer, pH 3, mit 0,5 %igem Rinder Serumalbumin. Die insulinenthaltenden Fraktionen wurden bei der Bestimmung des gesamten Insulins nach Neutralisierung lyophilisiert und der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen. Die anschließende Insulinbestimmung wurde nach dem in Abschnitt VI.2. beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Wiederfinderate von zugesetztem Insulin betrug in beiden Systemen zwischen 85 und 105 %.

Tab. 8 Insulinspiegel im Serum insulinbehandelter Diabetiker (Trennung des freien vom gebundenen Insulin mit Biogel P60)

Pat.	Zeit	BZ (mg%)	Insulin (μ E/ml)	
			frei	gesamt
I JM	6.55	142	172	-
	7.00	8E Depot Insulin Hoechst klar		
	9.30	217	217	319
	11.15	235	222	367
	13.00	286	220	372
	16.30	191	240	282
	16.45	8 E Depot Insulin Hoechst klar		
	18.30	141	171	-

Tab. 8 (Fortsetzung)

Pat.	Zeit	BZ (mg%)	Insulin (μ E/ml)	
			frei	gesamt
II				
AL	6.00	367	133	130
	7.00	44 E Depot Hoechst		
	9.00	334	153	224
	12.00	292	92	131
	14.00	142	99	-
	16.30	24 E Depot Hoechst		
	17.00	55	164	445

In der Tab. 8 sind einige mit diesem Verfahren ermittelte Werte zusammengestellt. Bestimmung des Spiegels von freiem und gebundenem Insulin wurde anhand einiger Tagesprofile durchgeführt, die an zwei typischen Beispielen dargestellt sind. Auffällig ist, daß gelegentlich außerordentlich hohe Insulinkonzentrationen im Serum vorkommen, die auch schon von HEDING (1965) sowie von KARAM u. Mit. (1969) mitgeteilt wurden. Das Verfahren der chromatographischen Abtrennung des freien Insulins vom Insulin-Antikörper-Komplex auf Biogel P 60 erlaubt eine äußerst schonende und saubere Abtrennung des freien Insulins und führt bei Wiederfinderversuchen zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Der erhebliche zeitliche Aufwand für die Einzelbestimmung und für die anschließende Regenerierung der Säulen erwies sich jedoch nachteilig für die Durchführung größerer Serien. Außerdem zeigte sich in der Folgezeit, daß es während der relativ langen Zeit der chromatographischen Abtrennung zu einer Abdissoziation von Insulin aus dem Insulin-Antikörper-Komplex kommt. Dies war der Grund dafür, daß die Spiegel an freiem Insulin zu hoch gemessen wurden. Die oben beschriebenen Methoden zur Bestimmung des freien Insulins waren in ihrer Reproduzierbarkeit und im Zeitaufwand unbefriedigend. Während das gesamte Insulin einiger-

maßen verlässlich bestimmt werden konnte, waren die Messung der Spiegel an freiem Insulin nicht befriedigend. Schon der Theorie nach sind Verfahren, die sich einerseits einer ziemlich unspezifischen Proteinfällung bedienen oder Methoden, wo, durch die langen Trennzeiten eine Abdissoziation des Insulins aus dem Insulin-Antikörper-Komplex zu erwarten war, als nicht besonders geeignet anzusehen. Die mit diesen Methoden gemessenen hohen Spiegel an freiem Insulin im Serum insulinspritzender Diabetiker - wie sie auch von anderen Untersuchern gefunden wurden - verführten zu der Annahme, daß bei Diabetikern nicht nur die Wirkung des Insulins durch zelluläre und humorale Antikörper, sondern auch durch Insulinantagonisten beeinträchtigt wird.

VI.3.2. Abtrennung des Insulin-Antikörper-Komplexes vom freien Insulin durch Fällung mit Polyäthylenglykol

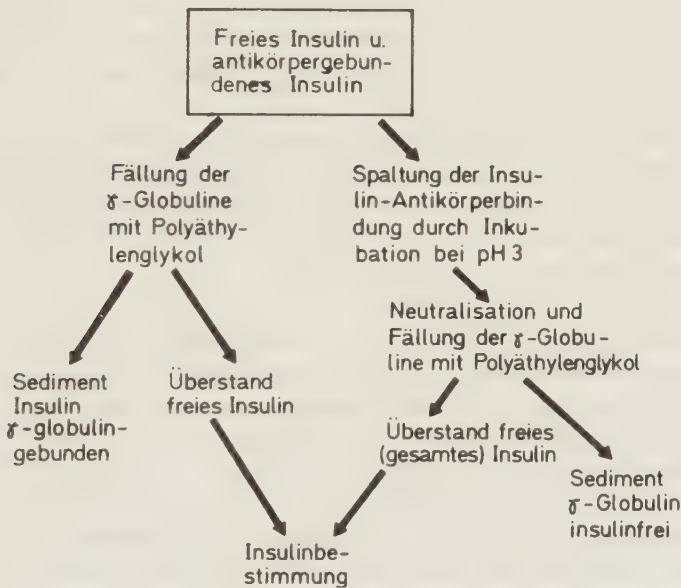
Mit einem neueren Verfahren, nach einer Methode von GENNARO u. VAN NORMAN (1975), die wiederum auf Arbeiten von DESBUQUOIS u. AURBACH (1971) und NAKAGAWA u. Mit. (1973) beruht, ließen sich die Schwierigkeiten einer unspezifischen Präzipitation des Insulin-Antikörper-Komplexes oder der hohe Zeitaufwand der chromatographischen Trennung, mit der Gefahr einer Dissoziation dieses Komplexes, vermeiden. Von den genannten Autoren wurden zur raschen Abtrennung der γ -Globulinen, zu denen auch die gegen Insulin gerichteten Antikörper gehören, die Fällung mit Polyäthylenglykol (Molekulargewicht ca. 6000, Firma Merck, Darmstadt) verwandt.

Die Polyäthylenglykol-Methode wurde geringfügig modifiziert und der oben beschriebenen Insulinbestimmung nach HERBERT u. Mit. (1965) angepaßt. Das schematische Vorgehen zur Abtrennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin zeigt Abb. 5.

0,5 ml Serum
+ 0,5 ml Polyäthylenglykollösung
(250 mg/ml Albuminpuff. s. VI.1.2)

vorgekühlt auf 0°C (Eisbad) werden gemischt und 4 Min. bei
ca. 12 000 xg zentrifugiert.

Abb. 5



Abtrennung des Insulin-Antikörper-Komplexes vom freien
Insulin durch Fällung mit Polyäthylenglykol

Der antikörperfreie Überstand, der nur noch das freie Insulin enthält kann ohne weitere Behandlung in die Insulinbestimmung eingesetzt werden.

Zur Messung des gesamten Insulins wurde der Insulinantikörperkomplex durch Vorinkubation bei pH 3 gespalten und der freie Antikörper ebenfalls mit Polyäthylenglykol präzipitiert.

0,5 ml Serum
+ 0,5 ml HCL (0,03 N)

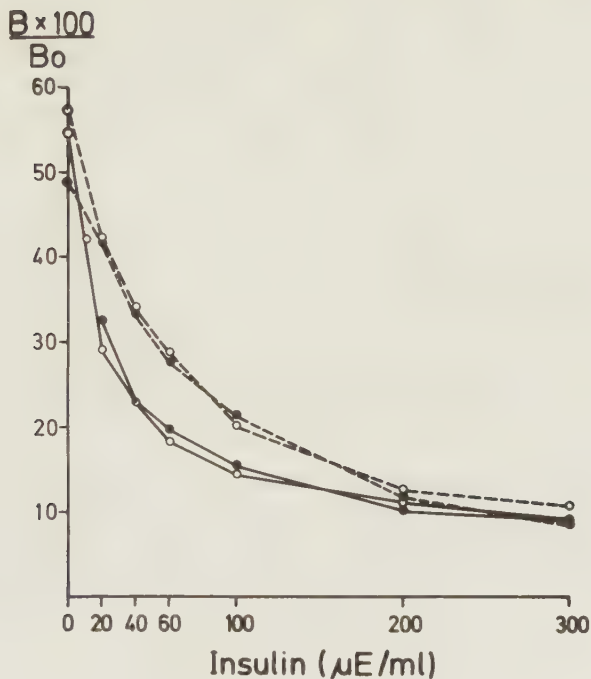
werden für 60 Min. bei 0°C (Eisbad) inkubiert, ausschließlich mit NaOH neutralisiert und einem 0,5 ml Aliquot sofort 0,5 ml der o. a. Polyäthylenglykollösung (0°C) zugesetzt und wie oben beschrieben weiterverfahren.

Aus den Erfahrungen von Insulin-Ringversuchen nach MARSCHNER u. Mit. (1974) wurden für die Insulin-Standardkurven insulinfreies Serum (Hunger Serum), das ebenfalls mit Polyäthylenglykol bzw. mit Ansäuern und Polyäthylenglykol vorbehandelt worden war, verwandt.

Abb. 6 zeigt Eichkurven der Insulinbestimmung, wie sie mit Standardinsulinen gelöst in insulinfreiem Serum, mit und ohne PEG-Vorbehandlung erhalten wurden. Gleichzeitig geht aus der Abbildung hervor, daß praktisch identische Verdrängung des Radioinsulins vom Antikörper im Test gefunden wird, wenn das insulinfreie Serum während der gesamten Inkubation oder insulinarmes Serum, z.B. Labtrol erst unmittelbar vor der Trennung des freien vom antikörpergebundenen Insulins durch das Kohle-Dextran-Gemisch zugesetzt wird.

Wird ein antikörperhaltiges Serum, das von einem seit längerer Zeit mit Insulin behandelten Diabetiker gewonnen wurde und das nach DIXON (1974) eine Insulinbindungskapazität von ca. 50 % enthielt einer Behandlung mit Polyäthylenglykol mit steigenden

Abb. 6



- - - - ○ POLYÄTHYLENGLYKOLBEHANDLUNG UND LABTROLZUSATZ AM ENDE DER INKUBATION
- - - - ● POLYÄTHYLENGLYKOLBEHANDLUNG UND HUNGERSERUM ZU BEGINN DER INKUBATION
- — ○ NORMALE EICHKURVE UND LABTROLZUSATZ AM ENDE DER INKUBATION
- — ● NORMALE EICHKURVE UND HUNGERSERUM ZU BEGINN DER INKUBATION

Eichkurven der Insulinbestimmung mit und ohne Polyäthylenglykol

Konzentrationen unterworfen, so zeigte sich, daß ab einer Konzentration von etwa 125 mg/ml Polyäthylenglykol die Fähigkeit zur Bindung von ^{125}J -Insulin verloren ging.

Der Verlust an insulinbindenden Antikörpern durch die Polyäthylenglykolbehandlung wird auch klar in der in Abb. 7 gezeigten elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine auf Celluloseacetatfolie. Nach Polyäthylenglykolbehandlung sieht man, daß die γ -Globuline vollständig, die α - und β -Globuline zum größten Teil präzipitiert worden waren.

Tab. 9 zeigt die Wiederfindung von 100 μE Insulin nach Polyäthylenglykolbehandlung. ^{125}J -Insulin wurde antikörperfreiem bzw. antikörperhaltigem Serum zugesetzt. Die Polyäthylenglykolbehandlung läßt im antikörperfreiem Serum das Insulin im Überstand, während im antikörperhaltigen Serum Insulin mit den γ -Globulinen gefällt wurde. Wird das antikörperhaltige Serum einer Kohle-Dextran-Behandlung unterworfen, so bleibt das gesamte zugesetzte Insulin im Überstand. Nach Spaltung des Insulin-Antikörper-Komplexes durch Vorinkubation bei pH 3 kann das zugesetzte Radioinsulin nicht mehr durch Polyäthylenglykol gefällt werden. Der niedrige Variationskoeffizient zwischen 0,7 und 3,9 erweist diese wenig störanfällige Methode als überaus geeignet zur raschen Abtrennung des freien- vom antikörpergebundenen Insulin.

Mit dieser Methode wurde bei einer Reihe von insulinpflichtigen Diabetikern 3 bis 4 Stunden nach der morgendlichen Insulininjektion der Spiegel des freien Insulins im Serum bestimmt (Tab. 10). Als auffallenster Befund dieser vorläufigen Untersuchung läßt sich feststellen, daß mit dieser Methode beim insulinbehandelten Diabetiker Insulinspiegel im Serum gemessen werden, die in einem Bereich liegen, wie er auch bei Normalpersonen zu erwarten ist.

Abb. 7

Elektrophoretische Auftrennung
der Serumproteine vor und nach
Polyäthylenglykolbehandlung



Tab. 9 Wiederfindung von 125 Jodinsulin, 100 μ E/Ansatz

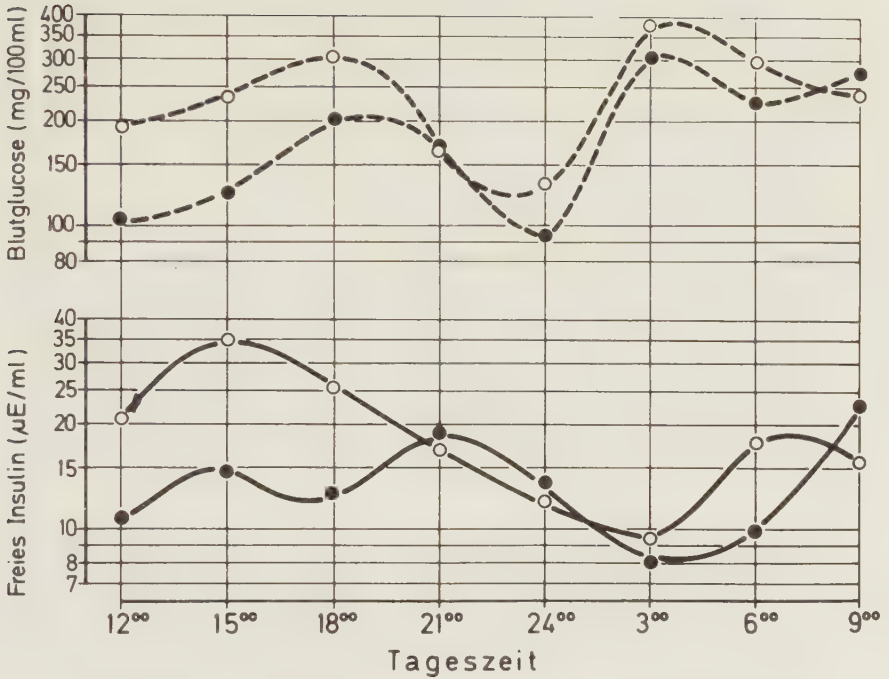
		Antikörperfreies Serum PEG-Fällung	PEG-Fällung	Antikörperhaltiges Serum	
				Kohle-Dextran Adsorption	Säurevorbehandlung und PEG-Fällung
Insulin im Überstand	X	92,5	3,8	94,6	91,5
	n	10	10	10	8
μ E/Ansatz	s	1,13	0,15	0,68	2,28
	Vk	1,4	3,9	0,7	2,5

Tab. 10 Freies Insulin im Serum insulinbehandelter Diabetiker
(3-4 Stunden nach Insulininjektion, 10.00 - 11.00 Uhr)

<u>Patient</u>	<u>Insulin μE/ml</u>	<u>Patient</u>	<u>Insulin μE/ml</u>
Ma/15c	35	Wo/15a	2
St/15c	24	Tr/15c	6
Pf/15c	30	Wi/15b	1
Ta/16c	41	Wa/15c	11
St/16c	22	Gr/15c	4
Fe/16c	35	Ka/15c	105
Vi/16c	91	Sa/15c	31
Sch/16c	59	Ge/15c	5
Fle/16c	52	Ob/15b	16
La/16c	65	Tr/15b	2
Kr/15b	15	Ma/15b	14

Mit der Polyäthylenglykol-Methode wurde bei einigen insulinpflichtigen Diabetikern Tagesprofile gemessen, wovon zwei Fälle exemplarisch in Abb. 8 dargestellt sind. Bei beiden Patienten wurden über 24 Stunden hinweg in 3-stündigem Abstand die Blutglukose und der Insulinspiegel im Serum gemessen. Dabei stellen die ausgefüllten und die leeren Symbole jeweils die beiden Parameter beim entsprechenden Patienten dar. Beide Patienten erhielten die gleiche Menge an Kohlehydraten über den Tag hinweg verteilt; beide Patienten bekamen annähernd die gleiche Menge an Insulin gespritzt. Der Tagesverlauf von Blutzuckerkonzentration und Seruminsulinspiegel ist bei beiden Patienten sehr ähnlich, obwohl es sich hier um zwei vom klinischen Bild her sehr unterschiedliche Diabetiker handelt.

Abb. 8



Totalinsulin (frei und antikörpergebunden)

● 840-2200 $\mu\text{E/ml}$

○ 50-225 $\mu\text{E/ml}$

Diät und Therapie:



32 EI. (7⁰⁰)



36 EI.

7³⁰ - 12⁰⁰, 120 gKH.



16 EI. (17⁰⁰)



32 EI.

14⁰⁰ - 16⁰⁰, 48 gKH.



32 EI. (7⁰⁰)



44 EI.

20⁰⁰, 24 gKH.

Tagesverlauf der Blutglukose und des freien Insulins im Serum
von zwei insulinpflichtigen Diabetikern

Die ausgefüllten Symbole stellen einen 55-jährigen Mann dar, dessen Diabetes erst seit 3 Monaten bekannt war, der von Anfang an absolut insulinpflichtig war und der in dieser kurzen Zeit seiner Diabetesbehandlung bereits in nennenswertem Maße Antikörper entwickelte. Im Serum dieses Patienten fanden sich bis zu 2200 $\mu\text{E/ml}$ an Gesamtinsulin.

Die leeren Symbole stellen einen 22-jährigen jungen Mann mit 10-jährigem insulinpflichtigen Diabetes dar. Hier fanden sich nur 50 - 200 $\mu\text{E/ml}$ Gesamtinsulin.

Beide Patienten hatten einen erhöhten Insulinbedarf. Auch hier zeigte es sich wieder, daß der Spiegel an freiem Insulin über den gesamten Tagesverlauf hinweg in einem Bereich liegt, wie er auch beim Nichtdiabetiker gefunden wird. Alle bisher publizierten Untersuchungen, in denen Insulinwerte von einigen Hundert $\mu\text{E/ml}$ Serum beim insulinbehandelten Diabetiker gemessen wurden, sind daher bedingt durch methodische Fehler als falsch anzusehen.

Während der Patient dargestellt durch die leeren Symbole bereits im Tagesverlauf einen über die Norm des guten Einstellungsniveaus erhöhten Blutzuckerwert aufweist, ist der durch die ausgefüllten Symbole charakterisierte Patient in der Zeit von 12.00 bis 24.00 Uhr als gut eingestellt zu betrachten.

Nach der letzten Insulininjektion abends um 17.00 Uhr und nach der letzten Abendmahlzeit um 20.00 Uhr sind Blutzucker und Insulinspiegel nicht mehr durch exogene Faktoren beeinflusst und dabei fällt es auf, daß in beiden Fällen bis nachts um 3.00 Uhr kontinuierlich eine Verringerung der Insulinmenge bis unter 10 $\mu\text{E/ml}$ nachzuweisen ist. Im gleichen Zeitraum steigt der Blutzucker, der in beiden Fällen um 24.00 Uhr zwischen 100 und 150 mg% war auf Werte von 300 bis 380 mg% an.

Ein noch nicht vollverständlicher geringer morgendlicher Wiederanstieg des Insulinspiegels vor der ersten Insulininjektion ist gleichzeitig von einem Abfall des Blutzuckers in beiden Fällen um etwa 100 mg% begleitet. Am Verhalten der beiden Parameter in der Nacht deutet sich -sowohl bei dem Patienten mit hohem Antikörper-, als auch bei dem mit niedrigem Antikörpertiter - eine reverse Beziehung zwischen Blutglukose und freiem Insulin an.

Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit Beobachtungen, die in jüngster Zeit von KUZUYA u. Mit. (1977) publiziert wurden. Auch diese Gruppe verwendete die Polyäthylenglykolfällung zur Abtrennung des gebundenen vom freien Insulin. Sie fanden bei neun jugendlichen Diabetikern zwischen 2,5 und 25,2 $\mu\text{E/ml}$ Serum freies Insulin bei 193- 3911 $\mu\text{E/ml}$ Gesamtinsulin. Darüberhinaus geht aus ihren Untersuchungen hervor, daß der Gipfel in der Konzentration an freiem Insulin mit dem maximalen Abfall der Blutglukose zusammentraf.

Es bedarf allerdings noch weiterer umfangreicher Untersuchungen über das Verhalten des freien und gebundenen Insulins beim insulinbehandelten Diabetiker um endgültig die Frage zu klären, inwieweit unter diesen Bedingungen -wie beim Gesunden- der Blutzuckerspiegel durch die Konzentration an freiem Insulin reguliert wird und inwieweit andere kontrainsulinäre Faktoren (z.B. Ketonkörper, freie Fettsäuren, Lipide) auf die Stoffwechselwirksamkeit von Insulin Einfluß nehmen.

VII. Zusammenfassung

Beim insulinbehandelten Diabetiker kommt es in jedem Fall nach Tagen bis Wochen zur Bildung von humoralen insulinbindenden Antikörpern. Die üblichen radio- und enzymimmunologischen Methoden zur Messung des Seruminsulinspiegels sind daher unbrauchbar. Die Verwendung von Polyäthylenglykol ermöglicht die quantitative Präzipitation von Antikörpern aus dem Serum. Mit dieser Methode ist es möglich rasch, schonend und vollständig freies und gebundenes Insulin zu trennen und beide Fraktionen separat zu bestimmen.

Vorläufige Messungen des freien Insulinspiegels im Serum deuten darauf hin, daß auch beim insulinbehandelten Diabetiker -wie beim Normalen- eine reverse Beziehung zwischen dem Gehalt an freiem Insulin und dem Blutglukosespiegel zu finden ist.

VIII. Literaturverzeichnis

Almeida, J., Cinader, B., Howartson, A.
Structure of antigen- antibody complexes, a study by
elektron microscope
J. Exp. Med. 118, 327 (1973)

Arquilla, E.R., Stavitzky, A.B.
The production and identification of antibodies to insulin
and their use in assaying insulin
J. Clin. Invest. 35, 458 (1956)

Attardi, G., Cohn, M., Hosibath, J., Lennox, E.S.
Antibody formation by rabbit lymph node cells. I-IV. J.
Immunolog. 92, 335, 346, 356, 372 (1962)

Balmain, J.H., Cox, C.P., Folley, S.J., McNaught, M.L.
Bioassay of insulin in vitro by manometric measurements
on slices of mammary glands
J. Endocrin. 11, 269 (1954)

Baney, R.N., Vasquez, J.J., Dixon, F.J.
Cellular proliferation in relation to antibody synthesis
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 109, 1 (1962)

Banting, F.G., Franks, W.R., Gairns, S.
Anti-insulinactivity of serum of insulin treated patient
Amer. J. Psychiat. 95, 562 (1938)

Beigelman, D.M.
Bioassay for insulin-like activity utilizing glucose uptake
by rat epididymal adepote tissue
Metabolism 9, 580 (1960)

Berson, S.A., Yalow, R.S., Baumann, A., Rothschild, M.A.,
Newerly, K.
Insulin J¹³¹ metabolism in human subjects: demonstration of
insulinbinding globulin in the circulation of insulin treated
subjects
J. Clin. Invest. 35, 170 (1956)

Berson, S.A., Yalow, R.S.
Ethanol fractionation of plasma and electrophoretic identification
of insulin-binding antibody
J. Clin. Invest. 36, 642-647 (1957)

Berson, S.A., Yalow, R.S.
Species-specificity of human anti-beef, porc insulin serum
J. Clin. Invest. 38, 2017-2025 (1959)

Berson, S.A., Yalow, R.S.
Preparation and purification of human insulin -J¹³¹-binding
to human insulin binding antibodies
J. Clin. Invest. 40, 1803 (1961)

Berson, S.A., Yalow, R.S.
Antigens in insulin: determinants of specificity of porcine
insulin in man
Sci. 159, 844 (1963)

Burnet, M.
Körpereigene und körperfremde Substanzen bei Immunprozessen
Stuttgart: Thieme 1973

Cerasi, E., Hogeman, O., Luft, R., Porath, J., Roovete, A.
Insulin antibodies: description of specific serum protein
localisation in a patient with insulin resistant diabetes
Diabetologia 2, 45-51 (1966)

Chao, P.V., Karam, J.H., Grodsky, G.M.
Insulin J¹³¹ binding in serum from normal and diabetic
subjects by ultracentrifugation and gel-filtration
Diabetes 14, 27 (1965)

Ceska, M., Grossmüller, F., Lundkvist, U.
Solidphase radioimmunoassay of insulin
Acta endocr. (Kbh.) 64, 111-125 (1970)

Davidson, J.E., Eddleman, E.E.
Insulin resistance; review of literature a report of a
case associated with carcinoma of pancreas
Arch. Inter. Med. 86, 727 (1950)

Deckert, T.
Autoimmunity and diabetes
Abst. Coll on Immunology of Insulin, London Sept. 1965

Desbuquois, B., Aurbach, G.D.
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound
peptide hormones in radioimmunoassays
J. Clin. Endocrinol. 33, 732 (1971)

Devey, M., Carter, D., Sanderson, C.J., Coombs, R.R.A.
IgD antibody to insulin
The Lancet II. 1280 (1970)

Devlin, J.G.
Evidence for the existence of an IgM immunoglobulin to insulin
Irish H. med. Sci. 6th series. No. 491, 507 (1966)

Devlin, J.G., O' Donovan, D.K.

Preferential beef/porc insulin binding capacity.
Radioimmuno-electrophoretic and chromatographic data
in patients with dermal reactions to insulin
Diabetes 15, 790 (1966)

Dixon, G.H.

Recombination of insulin A and B chains, hybrid insulin
and synthetic insulin
Proc. 2nd. Intern. Congr. Endocrin. London 1964, Int. Congr.
Ser. Nr. 83, p. 1207, Excerpta Medica Found, Amsterdam

Dixon, K.

Measurement of antibodies to insulin in serum
Clin. Chem. 20, 1275 (1974)

Dolovich, J., Schnatz, J.D., Reisman, R.E., Yagi, Y., Arbesman, C.
Insulin allergy and insulin resistance
J. Allergy 46, 127 (1970)

Dreyer, W.J., Benett, J.C.

The molecular basis of antibody formation
Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 864 (1965)

Dutton, R.W.

Importance of cell division for antibody production in an
in vitro system
Nature 192, 462 (1961)

Eisen, H.N., Karush, F.

Significance of valence in antibody interactions
J. Allergy 20, 39 (1949)

Fankhauser, S.

Zur Klinik und Therapie der Insulinresistenz
Praxis (Bern) 53, 185-189 (1964)

Federlin, K., Heinemann, G., Gigli, J., Ditschuneit, H.

Antigenbindung durch zirkulierende Leukozyten bei der
verzögerten lokalen Insulinallergie
Dtsch. Med. Wschr. 91, 814 (1966)

Fenton, E.L., Mann, C.B., Poge, G.G., Smith, G.H.

The production of circulating autoantibodies to guinea-pig
insulin. Abstr. Program, Autumn Meeting of Med.
Sci. Sect. of Brit. Diab. Ass. 1963

Galloway, J.A., Root, M.A.

New forms of insulin
Diabetes 21 (Suppl. 2), 637 (1972)

Gennaro, W.D., Van Norman, I.D.
Quantitation of free, total, and antibody-bound insulin in
insulin-treated diabetics.
Clin. Chem. 21, 873 (1975)

Gliemann, I.
Insulin-like activity of dilute human serum assayed by an
isolated adipose cell method
Diabetes 14, 643 (1965)

Goldner, M.G., Ricketts, H.G.
Insulin allergy: A report of eight cases with generalized
symptoms
J. Clin. Endocr. 2, 595 (1942)

Grodsky, G.M.
Production of auto-antibodies to insulin in man and rabbits
Diabetes 14, 396 (1965)

Groen, J., Kamminga, C.E., Willebrands, A.F., Blickman, J.R.
Evidence for the presence of insulin in blood serum
A method for an approximate determination of insulin
content in blood
J. Clin. Invest. 31, 97 (1952)

Günther, O.
Die Entstehung der Antikörper
Umschau 66, 89 (1966)

Günther, O.
Einführung in die Immunbiologie
Hippokrates, Stuttgart, 1969

Hansen, K., Eyer, H.
Klinische Studien über allergische Krankheiten:
Insulin-Allergie
Dtsch. Arch. Klin. Med. 174, 133-142 (1933)

Harris, J., Sanger, F., Naughton, M.A.
Species differences in insulin
Arch. Biochem. Biophys. 65, 427-438 (1956)

Heding, L.G.
Determination of free and antibody-bound insulin in insulin-
treated diabetic patients
Horm. Metab. Res. 1, 145 (1969)

Heding, L.G.
Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated
diabetic patients
Diabetologia 8, 260 (1972)

Herbert, V., Lau, K.-S., Gottlieb, C.W., Bleicher, S.
Coated charcoal immunoassay of insulin
J. Clin. Endocr. 25, 1375-1384 (1965)

Hilschmann, N.
Die Struktur der Antikörper
Selecta 34, 2656 (1969)

Haurowitz, F.
Chemistry and biology of proteins
Acad. Press N.Y. (1950)

Jagi, J., Arbesman, C.E., Reisman, R.E., Lenzner, A.R.
Multiplicity of insulin binding antibodies in human sera
J. Immunol. 90, 760 (1963)

Jerne, N.K.
Study of activity based on rabbit skin responses to diphtheria
toxin-antitoxin mixtures
Acta Path. Scan. 87, 3-183 (1951)

Jones, V.E. Cunliffe, A.C.
A precipitating antibody to insulin
Nature 192, 136-138 (1961)

Joslin, E.P., Gray, H.F., Root, H.F.
Insulin in hospital and home
J. Metab. Res. 2, 651-699 (1922)

Karam, I.H., Grodsky, G.M., Forsham, P.H.
Insulin-resistant diabetes with auto-antibodies induced by
exogenous insulin. Successful treatment by insulin with drawal
Diabetes 18, 445 (1969)

Karam, I.H., Levine, S.R., Lecharny, B., Grodsky, G.M.,
Forsham, P.H.
Circulating insulin levels in insulin-treated diabetics
Diabetes 18, 361 (1969)

Keane, P.M., Pearson, J., Walker, W.H.C.
Dextran-coated charcoal immunoassay of insulin
Diabetologia 4, 339-344 (1968)

Kerp, L., Steinhilber, S., Kielsing, F., Creutzfeld, W.
Klinisch experimentelle Untersuchungen zur Insulinallergie
und Insulinresistenz
Dtsch. Med. Wschr. 90, 806 (1965)

Kerp, L., Kasemir, H., Kielsing, F.
Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikern
Klin. Wschr. 46, 376-385 (1968)

Kerp, L.

Insulinbindende Antikörper, experimentelle und klinische Untersuchungen

In: Verb. Dtsch. Ges. Allergie- u. Immunitätsforsch.,
X. Kongreß, Bd. II, 1966, Stuttgart, Schattauer (1968)

Kuzuya, H., Blix, P.M., Horwitz, D.L., Steiner, D.F.,
Rubenstein, A.H.

Determination of free and total insulin and C-peptide in
insulin-treated diabetics.

Diabetes 26, 22 (1977)

Laprèsle, C.

Etude de la dégradation de la serumalbumine humaine par une
extrait de rate du lapin. II. Mise en évidence de trois
groupements spécifique différents dans le motif antigenique
de l'albumine humaine et de trois anticorps correspondants
dans le serum de lapin antialbumine humaine

Ann. Inst. Pasteur 89, 654 (1955)

Lerman, J.

Insulin resistance. The role of immunity in its production

Am. J. Med. Sci. 207, 354-360 (1944)

Lewis, J.H.

The antigenic properties of insulin

J. Amer. Med. Ass. 108, 1336-1338 (1937)

Lockwood, D.H., Prout, T.E.

Isoantibodies to insulin

Clin. Res. 10, 401 (1962)

Löffler, G.

Der Stoffwechsel des Fettgewebes bei Insulinmangel

In: Wieland, O., Mehnert, H. (Hrsgb.), Biochemie und Klinik
des Insulinmangels, S. 61, Stuttgart, Thieme 1970

Löffler, G., Weiss, L.

Radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Serum

In: Methoden der Hormonbestimmung, Georg Thieme Verlag
Stuttgart 1975, S. 75

Lowell, F.C.

Immunologic studies in insulin resistance. Measurement of an
insulin antagonist in the serum of an insulin resistant by
the blood sugar curve method in mice

J. Clin. Invest. 26, 57-63 (1947)

Manchester, K.L., Randle, P.J., Young, F.G.

An insulin assay based on the incorporation of labelled
glycine into the protein of isolated rat diaphragm

J. Endocrin. 19, 259 (1959)

- Martin, D.B., Renold, A.E., Dagenais, Y.M.
An assay for insulin-like activity using rat adipose tissue
Lancet II, 767 (1958)
- Marsch, J.B., Haugaard, N.
The effect of serum from insulinresistant cases on the
combination of insulin with the rat
Diaphragm. J. Clin. Invest. 31, 107 (1952)
- Marschner, I., Bottermann, P., Erhardt, F., Linke, R.,
Löffler, G., Maier, V., Schwandt, P., Vogt, W., Scriba, P.C.
Group experiments on the radioimmunological insulin
determination
Horm. Metab. Res. 6, 293 (1974)
- Marschner, I., Erhardt, F.W., Scriba, P.C.
In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine
Vol. 1, 111, Proc. Symp. Istanbul I.A.E.A., Wien 1974
- Meade, R.G., Klitgaard, H.M.
A simplified method for immunoassay for human serum insulin
J. nucl. Med. 3, 407 (1962)
- Melani, F., Ditschuneit, H., Bartelt, K.M., Friedrich, H.
Pfeiffer, E.F.
Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin
Klin. Wschr. 43, 1000-1007 (1965)
- Midgley, A.R., Jr., Niswender, G.D., Regar, R.W.
Principles for the assessment of the reliability of radio
immunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity,
specificity)
Acta Endocrinol 63. Suppl. 142, 163 (1969)
- Moinat, P.
A quantitative estimation of antibodies to exogenous insulin
in diabetic subjects
Diabetes 7, 462 (1958)
- Morcos, R.H., Abd, E., Naby, S., Ditschuneit, H., Pfeiffer, E.F.
Über die Ursache der Insulinresistenz bei der Insulinschock-
therapie
Med. Klin. 60, 1073 (1965)
- Morse, J.H.
Rapid production and detection of insulin-binding antibodies
in rabbits and guinea-pigs
Proc. Soc. Exp. Biol. 101, 722 (1959)
- Morse, J.H., Heremans, J.F.
Immuno-electrophoretic analysis of humans insulin-binding
antibody and its papain-produced fragments

Nakagawa, S., Nakayama, H., Sasaki, T., Yochino, K., Yu, Y.Y., Shinozaki, K., Aoki, S., Mashimo, K.

A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients

Diabetes 22, 590 (1973)

Nossal, G.J.V., Mäkelä, O.

Kinetic studies on the incidence of cells appearing to form two antibodies

J. Immunol. 88, 604 (1962)

Nossal, G.J.V., Enzenberg, A., Ada, G.L. Austin, C.M.

Single cell studies on 19 S antibody production

J. Exper. Med. 119, 485 (1964)

Oakley, W., Field, J.B., Sowton, G.E., Rigby, B., Cunliffe, A.C.

Action of prednisone in insulin resistant diabetes

Brit. med. J. 1601-1606 (1959)

Ohneda, A., Toyota, T., Sato, S., Yamagata, S.

Extraction of plasma insulin in radioimmunoassay for removal of nonspecific inhibitor and of circulating insulin antibody

Tohoku J. exp. Med. 100, 75 (1970)

Pav, J., Jezkova, Z., Skrha, F.

Insulin antibodies

Lancett II, 221 (1963)

Pearson, M.I., Martin, F.I.R.

The separation of total plasma insulin from binding proteins using gel-filtration: its application to the measurement of rate of insulin disappearance

Diabetologia 6, 581 (1970)

Pfeiffer, E.F., Ditschuneit, H.

Aktuelle Probleme der Diabetestherapie

Dtsch. Med. Wschr. 87, 2290 (1962)

Pfeiffer, E.F.

Insulin im Blut

Gastroenterologia, Suppl. ad, 104, 46-74 (1965)

Poznanski, N., Poznanski, W.J.

Laboratory application of the dextran-coated-charcoal radioimmunoassay of insulin

Clin. Chem. 15, 908-918 (1969)

Randle, P.J.

Assay of plasma insulin activity by the rat diaphragm method

Brit. Med. Bull. I, 1237 (1954)

Robinson, B.H.B., Wright, P.H.

Guinea-pig anti-insulin serum

J. Physiol. 155, 302-310 (1961)

Root, M.A., Chance, R.E., Galloway, I.A.

Immunogenicity of insulin

Diabetes 21 (Suppl. 2), 657 (1972)

Rosselin, G., Assan, R., Yalow, R.S., Berson, S.A.

Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones
labelled with iodine-131 by talcum powder and precipitated
silica

Nature 212, 355 (1966)

Renold, A.E., Soeldner, J.S., Steinke, J.

Immunological studies with homologous and heterologous
pancreatic insulin in the cow

Ciba Foundation Coll. Endocrinol. 15, 122 (1964)

Samols, E., Biekus, D.

A comparison of insulin immunoassays

Proc. Soc. exp. Biol. 155, 79-84 (1964)

Samols, E., Jones, V.

Insulin resistance, and the relationship of human anti-
bodies to insulin when measured by three different methods

1. Jahresvers. Europ. Ges. Diabetesforsch. Montecatini,
20. - 22.4.1965 Abstr. No. 16

Sanger, F.

Chemistry of insulin

Brit. Med. Bull. 16, 183-188 (1960)

Schirren, C., Sauer, H.

Zur Frage der Insulinallergie

Ärztl. Forschung 10, I., 175-178 (1956)

Schlichtkrull, I., Brange, I., Christiansen, Aa.H.,

Hallund, O., Heding, L.G., Jorgenson K.H.

Clinical aspects of insulin-antigenicity

Diabetes 21 (Suppl. 2), 649 (1972)

Skelley, D.S., Brown, L.P., Besch, P.K.

Radioimmunoassay

Clin. Chem. 19, 2, 146-186 (1973)

Skom, J.H., Talmage, D.W.

The role of nonprecipitating insulin antibodies in diabetes

J. Clin. Invest. 37, 787 (1958)

Skom, I.H., Talmage, D.W.

Nonprecipitating insulin antibodies

J. Invest. 37, 783-786 (1958)

Soeldner, I.S., Slone, D.

Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin
using the double antibody technique

Diabetes 14, 771-779 (1965)

Steigerwald, D., Spielmann, W.
Nachweis von Insulinantikörpern bei Diabetikern mit Insulin-
resistenz im Hämagglutinationstest und Coombstest
Klin. Wschr. 34, 80 (1956)

Trautschold, J., Lohmann, E., Domow, H., Löffler, G.
Abstr. VII th. Int. Congr. Clin. Chem.
Genf, Sept. 8 - 13, 1969

Tuft, L.
Insulin hypersensitivity: immunologic considerations and
care reports
Amer. J. Med. Sci. 196, 707-720 (1928)

Vallance-Owen, J., Hurlock, B.
Estimation of plasma-insulin by the rat diaphragm method
Lancet I, 68 (1954)

Vallance-Owen, J., Wright, P.H.
Assay of insulin in blood
Physiol. Rev. 40, 219-244 (1960)

Wasserman, P., Broh-Kahn, R.H., Mirsky, I.A.
The antigenic property of insulin
J. Immunol. 38, 213-219 (1940)

Weiss, L., Löffler, G.
Bestimmung der insulinähnlichen Aktivitäten (ILA) im Serum
mit Zellen des epididymalen Fettgewebes der Ratte
In: Methoden der Hormonbestimmung, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart 1975, S. 89

Welsh, G.W., Henley, E.D., Williams, R.H., Cox, R.S.
Insulin J¹³¹ metabolism in man. plasma binding distribution
and degradation
Amer. J. Med. 21, 324 (1956)

Wide, L., Porath, J.
Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-
coupled antibodies
Biochem. Biophys. Acta 130, 257 (1966)

Wilson, S., Dixon, G.H., Wardlaw, A.C.
Resynthesis of cod insulin from its polypeptide chains and
the preparation of cod-ox "Hybrid" insulins
Biochem. Biophys. Acta 62, 483 (1962)

Willebrands, A.F., Van der Geld, H., Groen, J.
Determination of serum insulin using the isolated rat
diaphragm: The effect of serum dilution
Diabetes X, 119 (1958)

Williams, R.H.
Insulin distribution and degradation
Metabolism 5, 128-137 (1956)

Wright, P.H.
Production of acute insulin deficiency by administration
of insulin antiserum
Nature 183, 829 (1959)

Yagi, Y., Maier, P., Prssman, D.
Two different anti-insulin antibodies in guinea pig antisera
J. Immunol. 89, 442 (1962)

Yalow, R.S., Berson, S.A.
Plasma insulin in man
Amer. J. of Med. 29, 1 (1960)

Yue, D.K., Turtle, J.R.
Antigenicity of "monocomponent" pork insulin in diabetic subjects.
Diabetes 24, 625 (1975)

An dieser Stelle danke ich Herrn Professor Dr.med.H.Mehnert und Herrn Professor Dr.med. O.Wieland, Leiter des Instituts für Diabetes-Forschung am Klinikum München-Schwabing für die Überlassung des Themas.

Besonders danke ich Herrn Professor Dr.med. G.Löffler und Herrn Privat-Dozent, Chefarzt Dr.med.L.Weiss für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

29.7.1946	in München geboren
4.9.1952	Einschulung in die Volksschule an der Türkenstraße, München
12.9.1956	Übertritt in das Alte Realgymnasium München
20.6.1965	Schulabschluß mit der Reifeprüfung
Nov. 1965	3-semestriges Studium des Bauingenieurwesens an der Technischen Universität München
2.5.1967	Beginn des Medizinstudiums an der Universität München
9.10.1968	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2.10.1969	Ärztliche Vorprüfung
22.6.1973	Abschluß des Medizinstudiums mit dem Staatsexamen
1.7.1973 bis 31.12.1973	Ableistung der Medizinalassistentenzeit am Städtischen Krankenhaus München-Schwabing
1.9.1974 bis 28.2.1975	Tätigkeit als Medizinalassistent an der Unfallklinik Murnau
Nov. 1975	Heirat
seit 1.1.1976	als chirurgischer Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Ottobeuren tätig

